PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:
C12Q 1/68	A2	WO 99/58713
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01471

(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Mai 1999 (10.05.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 22 108.8 12. Mai 1998 (12.05.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BIOINSIDE GMBH [DE/DE]; Warthestr. 21, D–14513 Teltow (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: GERBLING, Klaus–Peter [DE/DE]; Peschkestrasse 3, D–12161 Berlin (DE). LAUTER, Frank–Roman [DE/DE]; Ritterstrasse 25A, D–14513 Teltow (DE). GROHMANN, Lutz [DE/DE]; Stubenrauchstrasse 21, D–12161 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS IN PRODUCTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DETEKTION VON MIKROORGANISMEN IN PRODUKTEN

(57) Abstract

The invention relates to a detection method and a test kit for economic detection of germs in pharmaceutical and cosmetic products. The invention uses specific probes and primers whose replication is made visible by means of a special indicator system, whereby a fluorescent colorant is released.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Detektionsverfahren und ein Testkit zur schnellen, ökonomischen Detektion von Keimen in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten. Dabei werden spezifische Sonden und Primer eingesetzt, deren Replikation durch ein spezielles Indikatorsystem sichtbar gemacht wird, wobei ein Fluoreszenz–Farbstoff freigesetzt wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen in Produkten

Die Erfindung umfaßt Verfahren zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht - steriler Produkte, bevorzugt nach GMP - Richtlinien. Weiterhin umfaßt die Erfindung einen Testkit zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen und die Verwendung von Primersequenzen und Sondensequenzen zur Bestimmung von Mikroorganismen in Produkten, insbesondere in Arzneimitteln und Kosmetika einschließlich ihrer Ausgangsstoffe und Zwischenprodukte.

Das Verfahren dient zur quantitativen Identifizierung von Mikroorganismen durch Detektion spezifisch amplifizierter DNA-Sequenzen und soll als Ersatz entsprechender Methoden in der Europäischen Pharmakopöe, Abschnitt 2.6.12-13,1997 (EP) sowie weiteren nationalen Monographien wie zum Beispiel USP eingesetzt werden.

Die Herstellung von Arzneimitteln und Kosmetika nach GMP - Richtlinien beinhaltet chemische, physikalische und biologische Prüfungen zur Sicherstellung der Qualität. Bei Kosmetika muß der Hersteller dafür sorgen, daß von den Fertigprodukten keine Gesundheitsgefährdung ausgeht (EG Kosmetikverordnung, 76, 768 EWG (KOSVO), 6). Änderungsrichtlinie der EG KOSVO 93/35/EEC, 1993 und Forderungen des nationalen Rechts in Deutschland (LMBG § 24).

Bei Arzneimitteln sind die mikrobiologischen Reinheitsanforderungen wesentlich präziser und decken die Anforderungen der KOSVO mit ab (EP Abschnitt 2.6.12-13,1997).

Die Anforderungen beinhalten zwei Gruppen:

(i) Die Zählung der gesamten lebensfähigen aeroben Bakterien und Pilze (Gruppe Gesamtkeimzahl) sowie

(ii) Den Abwesenheitsnachweis bestimmter Mikroorganismen: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Streptococcus faecalis,* Salmonellen und Enterobactriaceae (Gruppe Leitkeime).

Stand der Technik

Keimzahlbestimmung mit Nährmedien

Als Methoden zur Zählung der gesamten lebensfähigen aeroben Bakterien (Gruppe Gesamtkeimzahl) werden in der EP konventionelle mikrobiologische Techniken beschrieben, die das Wachstum der nachzuweisenden Mikroorganismen in bestimmten

Flüssignährmedien oder auf Agarplatten beinhalten. Im Handel sind zahlreiche entsprechende Fertigprodukte oder deren Ausgangsstoffe erhältlich.

Die Anwendung der in der EP beschriebenen Methoden zur Bestimmung der aeroben Keime (Gruppe Gesamtkeimzahl) hat folgende Nachteile:

- Die Effizienz ist niedrig, da hoher Zeitbedarf bis zum Ergebniserhalt (3-5 Tage) besteht.
- Die Ergebnisse sind unpräzise. Die Akzeptanzgrenzen dürfen um den Faktor 5 schwanken, EP, Abschnitt 2.6.12
- Die Testmethoden sind schlecht und nur im geringen Maße automatisierbar.
- Bedingt durch die Nährmedieneigenschaften können nur gut wachsende Mikroorganismen, nicht aber, wie gefordert, alle aeroben Mikroorganismen nachgewiesen werden.
- Die Lagerhaltungskosten sind für Medien und Brutschränke hoch.
- Bei Arzneimitteln mit bakteriostatischen Eigenschaften führt die Anwendung der EP - Methoden aufgrund der geringen Wiederfindung zugesetzter Testmikroorganismen teilweise zu nicht verwertbaren Ergebnissen.
- Umfangreiche Plastikabfälle fallen an.
- Die Energiekosten für Medienherstellung und Autoklavieren der anfallenden Abfälle sind hoch.
- Die Fertilitätsprüfung aller Medienchargen ist sehr aufwendig insbesondere wegen kurzer Haltbarkeiten von Fertigmedien.

Alternative Methoden zur Gesamtkeimzahlbestimmung im Handel sind: Geräte, die mittels Laserscan arbeiten wie z.B. CHEMSCAN (Chemunex):

- Diese Methode ist ungeeignet zum Nachweis von Mikroorganismen, die wie die Bakteriengattung Sarcina keine Einzelkolonien bilden.
- Außerdem eignet sich diese Methode nicht für feste und ölige Prüfprodukte.

Nachweis spezieller Mikroorganismen durch unterschiedliche Kultureigenschaften und spezielle Stoffwechselprodukte

Als Methoden zur Bestimmung spezieller Keime (Gruppe Leitkeime) werden in der EP mikrobiologische Techniken beschrieben, die zur Grobdifferenzierung das Wachstum der jeweiligen Mikroorganismen in bestimmten selektiven Nährmedien oder auf Agarplatten beinhalten. Anschließend werden zur Feindifferenzierung spezifische Stoffwechselreaktionen der jeweiligen Mikroorganismen wurde genutzt. Entsprechende Nachweissysteme, wie z.B. APILAB oder VITEK, sind weit verbreitet.

Die Anwendung der in der EP beschriebenen Methoden zur Bestimmung der speziellen Keime (Gruppe Leitkeime) hat die gleichen Nachteile, wie für die Anwendung der EP -

geforderten Methoden zur Bestimmung der aeroben Keime (siehe oben). Ein zusätzlicher Nachteil ist, daß die Selektivität der Nachweismethoden auf Stoffwechselunterschiede beschränkt ist und damit nur unzureichende Differenzierungen zuläßt.

Nachweis spezieller Mikroorganismen durch ATP- Gehaltsbestimmung nach Vorkultivierung

Alternative Methoden im Markt sind: Mikrobiologische Schnelltests, beruhend auf einem Vitalnachweis durch ATP - Bestimmung (z.B. Firma Millipore) nach Vermehrung der Mikroorganismen in Nährmedien.

Nachteil: Speziesbestimmungen sind nicht möglich und die Meßergebnisse unterliegen hohen Schwankungen in Abhängigkeit des Vitalitätszustands und sind für unterschiedliche Bakteriengattungen sehr verschieden.

Nachweis spezieller Mikroorganismen nach Vorkultivierung mittels DNA-Sonden, Primern und PCR

Weitere alternative Methoden im Handel sind unterschiedliche PCR - Applikationen, die aber, wie z.B. bei Chen et al. 1997, J.. Food Microbiol. 35, 239-250 auf die Prüfung von Lebensmitteln ausgerichtet sind und eventuell nicht die strengen GMP - Anforderungen an die Qualitätsprüfung von Arzneimitteln erfüllen.

- Die vorhandenen PCR - Applikationen sind in der Regel anfällig für Kontaminationen durch PCR - Produkte, sind wenig reproduzierbar und schwer quantifizierbar. Darüber hinaus sind sie zeitaufwendig, da bei den alternativen PCR - Verfahren in der Regel mehrere Hybridisierungsschritte zur Detektion des PCR - Produktes notwendig sind.
- Diese Technologien sind in der Regel außerdem nur begrenzt automatisierbar und störanfällig, da in der Regel zu mehreren Zeitpunkten der Applikation verschiedene Reagenzien zugegeben werden müssen.

Bei dem Verfahren gemäß der Patente US 4,800,159 und US 4,683,195 wird die zu amplifizierende Nukleinsäure, die einzelsträngig vorliegt oder einzelsträngig gemacht wird, mit einem molaren Überschuß zweier Oligonukleotidprimer unter Hybridisierungsbedingungen und in Gegenwart eines induzierenden Agens für die Polymerisation und Nukleotiden behandelt, wobei die Primer so gewählt werden, daß für jeden Strang ein zum Nukleinsäurenstrang komplementäres Verlängerungsprodukt des betreffenden Primers synthetisiert wird und daß ein Verlängerungsprodukt eines Primers, wenn es von seinem Komplement getrennt ist, als Matrize zur Synthese eines Verlängerungsproduktes des anderen Primers dienen kann. Nach Trennen der Verlängerungsprodukte von den Matrizen, an denen sie synthetisiert wurden, können

die gebildeten Verlängerungsprodukte zur erneuten Umsetzung mit den Primern verwendet werden. Durch die zyklische Wiederholung der Schritte ergibt sich eine theoretisch exponentielle Vermehrung einer Nukleinsäuresequenz, die innerhalb der äußeren Hybridisierungspositionen der Primer liegt.

Quantitativer Nachweis von Mikroorganismen - DNA durch eine spezielle Fluoreszenz - PCR - Technologie

Eine verfeinerte Methode ist das Verfahren gemäß Patent US 5,210,015 von Gelfand et al. Dabei wird eine Oligonukleotid-Sondenkonstruktion verwendet, die mit einem Teil des Nukleinsäurestrangs der Matrize hybridisiert, wobei die Oligonukleotidsonde so ausgewählt wird, daß sie zwischen die Primerpaare (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) für die Amplifikation der diagnostischen Zielsequenz des jeweiligen Mikroorganismus paßt. Die Sondenkonstruktion und Synthese basiert auf der TaqMan - Technologie (Holland et al. 1993 und Lee et al. 1993, Nucl. Acids. Res, Vol 21, p 3761 - 3766).

Chemische Grundlage dieser neuen Methode ist der 1991 erstmalig publizierte 5'-Nuklease PCR - Assay (Holland et al. 1991, PNAS USA 88: 7276). Kernstück dieser Methode ist die 5'-Nuklease-Aktivität der TaqPolymerase und der Einsatz von fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Gensonden. Diese Gensonden sind am 5'-Ende mit einem Fluoreszein - Derivat (Reporter) und am 3'-Ende mit einem Rhodaminderivat (Quencher) markiert. Durch die räumliche Nähe beider Farbstoffe wird die Fluoreszenzstrahlung des Reporters von dem Quencherfarbstoff absorbiert. Während der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden Reporter und Quencher durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq - Polymerase räumlich voneinander getrennt. Die Fluoreszenzstrahlung des Reporters wird nicht mehr gequencht und kann direkt gemessen und quantifiziert werden. Je mehr Sonden gespalten werden, desto höher ist die Fluoreszenz - Emission der Reportermoleküle. Die Menge an freigesetzter Emission ist der Menge der entstehenden PCR Produkte proportional und diese ist wiederum der Kopienzahl der in der PCR eingesetzten Gene proportional. Über die Genkopienzahl läßt sich die in der Analysenprobe vorhandene Organismenzahl berechnen. Die Methode ist extrem sensitiv, da während der PCR Reaktion eine Genvermehrung und somit eine Signalamplifikation stattfindet. Da verschiedene Reporterfarbstoffe am Markt zur Verfügung stehen, können interne Kontrollen und Standards bei jeder Reaktion mitgeführt werden. Darüber hinaus kann eine Probe auf das Vorhandensein mehrerer Gene/Organismen gleichzeitig untersucht werden. Zur Zeit stehen im Handel drei verschiedene Reporterfarbstoffe zur Verfügung.

Aufgabe und Lösung

Aufgabenschwerpunkt der vorliegenden Erfindung bildet die Entwicklung von Nachweisverfahren für Mikroorganismen, die erfahrungsgemäß häufig als Produktkontaminanten auftreten. Das sind insbesondere in Bezug auf die Gruppe der Leitkeime: *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus,* Salmonellen Arten, in Bezug auf die Gruppe Gesamtkeimzahl: die Bakterien und die Enterobacteriaceae.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Reagenzien, Verfahren und die Verwendung von Substanzen, die den Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht - steriler Produkte zum Beispiel entsprechend Anforderungen der EP einfacher, präziser und effizienter gestalten. Dabei sollen weniger Komponenten als zum Beispiel entsprechend Anforderungen der EP enthalten sein. Eine weitere Aufgabe ist es, sehr sensitive und quantitative Nachweise für die geforderten Mikroorganismen zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Testkit zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht steriler Produkte, insbesondere nach GMP - Richtlinien, auch Kosmetika und Lebensmittel, umfassend mindestens ein DNA-Fragment, das die folgenden SEQ ID und Spacer (Abstandhalter) umfaßt:

(a) einen Forward-Primer (SEQ ID $_{\text{Forward-Primer}}$);

(b) eine Sonde (SEQ ID $_{\text{Sonde}}$);

(c) einen Reverse-Primer (SEQ ID $_{\text{Reverse-Primer}}$);

(d) gegebenenfalls einen Spacer zwischen Forward-Primer und Sonde,

(e) gegebenenfalls einen Spacer zwischen Sonde und Reverse-Primer,

(f) gegebenenfalls einen Spacer $_{\text{upstream}}$ des Forward-Primers

(g) gegebenenfalls einen Spacer $_{\text{downstream}}$ des Reverse-Primers

- wobei die SEQ ID [(SEQ ID $_{\text{Forward-Primer}}$); (SEQ ID $_{\text{Sonde}}$); und (SEQ ID $_{\text{Reverse-Primer}}$)] auch Varianten umfassen, bei denen eine, zwei oder drei Nukleotide substituiert, deletiert und / oder insertiert sind,

 dabei hat die Variante im wesentlichen dieselbe Funktion wie die Sequenz der SEQ ID [(SEQ ID $_{\text{Forward-Primer}}$); (SEQ ID $_{\text{Sonde}}$); und (SEQ ID $_{\text{Reverse-Primer}}$)],

 bei Sonden die Funktion der Bindung an DNA und

 bei Primern die Funktion der Bindung an DNA und die Bereitstellung eines verlängerbaren 3' Endes für die DNA - Polymerase;

- wobei die Spacer 0-40 Nukleotiden umfassen,

das DNA-Fragment genommen aus der Gruppe

(i) für *Staphylococcus aureus*
SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer

(ii) für *Pseudomonas aeruginosa*
SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer

(iii) für *Escherichia coli*
SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer

(iv) für *Salmonella ssp.*
SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer

(v) für Bakterien
SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer

(vi) für Enterobacteriaceae
SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer

(vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)
SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer

oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen SEQ ID NO 6 bis 49 sind.

Vorteilhaft ist eine Kombination aus zwei mehr bevorzugt aus drei noch mehr bevorzugt aus vier und am meisten bevorzugt aus fünf, sechs oder sieben Gesamtsequenzen.
Bevorzugt ist ein Kit mit PCR Reagenzien.
Mehr bevorzugt ist ein Kit mit PCR Reagenzien und TaqMan.

Alle genannten Sequenzen sind in dem Beispiel 24 aufgeführt. Für eine erfolgreiche TaqMan - PCR werden an die Primer- und Sondensequenzen (Beispiel 24) folgende Anforderungen gestellt:

- Primer sollten zwischen 15-30 Basen lang sein.
- Sondensequenz muß sich zwischen Primer - Sequenzen auf der zu amplifizierende DNS befinden.
- Sonde sollte zwischen gegebenenfalls 18-30 Basen lang sein.
- Sonde sollte einen GC - Gehalt von 40 - 60% besitzen.
- Der Tm der Sonde (Schmelzpunkt) sollte um 5 - 10 C° über dem Tm der Primer liegen
- Am 5' Ende der Sonde sollte sich kein G befinden.
- In der Sondensequenz sollte nie mehr als 3 mal dieselbe Base hintereinander folgen.
- Keine Komplementarität zwischen Sonde und Primern oder innerhalb der Primer und keine auffälligen Sekundärstrukturen innerhalb der Sonde und der Primer.

Trotz dieser allgemeinen Richtlinien für das Design von Primern und Sonden (Livak et al. 1995, Guidelines for designing Taqman fluorogenic probes for the 5' Nuclease assays, Perkin Elmer Research News) muß die optimale Primer- und Sondenkombination für jede TaqMan - PCR - Anwendung neu experimentell bestimmt werden. Es konnte in einer Reihe von Beispielen (Beispiel 25) gezeigt werden, daß obwohl oben genannten Richtlinien eingehalten wurden, kein optimales TaqMan PCR System entwickelt werden konnte. Auf der anderen Seite ist man durch die Sequenzcharakteristika der diagnostischen Zielsequenz des jeweiligen Organismus (z.B. hoher GC Gehalt, stark repetitive Sequenzen oder konservierte Sequenzbereiche) ggf. gezwungen, Primer- und Sondensequenzen auszuwählen, die nicht den oben genannten Designrichtlinien entsprechen. Konsequenz dieser Einschränkungen zu den Richtlinien ist, daß zum Erreichen der notwendigen Spezifität und Sensitivität eines TaqMan - PCR - Tests die Auswahl der diagnostischen Zielsequenz aus dem Genom des zu detektierenden Mikroorganismus und die experimentelle Determinierung der optimalen Primer- und Sondensequenzen essentiell ist.

d.PCR - Reaktionsbedingungen einschließlich TaqMan Puffer:
Die Spezifität und Sensitivität eines TaqMan - PCR Tests wird neben den Primer- und Sondensequenzen (a - c) durch folgende Parameter bestimmt:

(i) Höhe der Denaturierungstemperatur in den ersten PCR - Zyklen
(ii) Höhe der Annealingtemperatur während der Amplifikationsphase der PCR
(iii) Anzahl der PCR Zyklen
(iv) Einsatz von PCR - Additiven wie Glyzerin und / oder Formamid
(v) Einsatz von 7-Deaza-2-deoxy-GTP neben GTP bei Genen mit hohem G/C Gehalt
(vi) Höhe der Mg^{++}- Ionen - Konzentration im PCR - Puffer
(vii) Konzentration der Primer und Sonde
(viii) Menge an Taq - DNA - Polymerase
(ix) Abstand des cis - orientierten Primers zur Sonde

Alle diese Parameter wurden bei der Entwicklung hier aufgeführten TaqMan - PCR Tests experimentell berücksichtigt (Daten nicht gezeigt).

Beschreibung der Nukleinsäuren, die als diagnostische Zielsequenzen eingesetzt werden:

Unter den Nukleinsäuren, die zur Verwendung des Amplifikationsverfahren und Nachweisverfahrens für die oben genannten Zielorganismen verwendet werden können, werden insbesondere genomische Nukleinsäuren verstanden. Genomische Nukleinsäure- Sequenzen enthalten unter anderem auch die Gene bzw. Genfragmente, die für eine bestimmte Mikroorganismenart, -gattung, -familie oder -abteilung charakteristisch sind. Die Nukleinsäuresequenzen können in einen PCR - Test als diagnostische Zielsequenzen für einen spezifischen Nachweis dieser Art, Gattung, Familie oder Abteilung eingesetzt werden.

Für den Nachweis der oben genannten Zielorganismen wurden folgende Zielsequenzen ausgewählt:

Organismus/nen		Genbezeichnung
(i)	*Staphylococcus aureus*	*cap 8*
(ii)	*Pseudomonas aeruginosa*	*alg Q*
(iii)	*Escherichia coli*	*mur A*
(iv)	*Salmonella ssp.*	*inv A*
(v)	Bakterien	16S r RNA

Die Gene, aus denen die diagnostischen Zielsequenzen ausgewählt wurden, werden in den Beispielen detailliert beschrieben.

Definitionen:

Primerdefinition (inklusive deren Variationen): Unter einem Primer wird ein Molekül verstanden, das an einem polymeren Grundgerüst eine Anzahl von Nukleotiden aufweist. Die Sequenz der Nukleobasen wird so gewählt, daß sie zu aufeinanderfolgenden Basen der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz zu mehr als 80% komplementär sind. Dieses Molekül besitzt jeweils mindestens ein verlängerbares Ende. Unter Verlängerung wird insbesondere die enzymkatalysierte Ankopplung von Baseneinheiten unter Verwendung von Mononukleosid - Triphosphat - Einheiten oder Oligonukleotiden verstanden. Als Enzym wird bevorzugt eine DNA - Polymerase eingesetzt. Die Nukleinsäure, die Nukleotidsequenzen enthält, welche amplifiziert werden sollen, dient hierbei als Matrize für den spezifischen Einbau von Basen. Die Sequenz der Matrize bestimmt die Sequenz der an den Primer angehängten Basen. Als Primer werden Moleküle mit 15-30 Basen verwendet. Als verlängerbares Ende dient im Falle einer DNA - Polymerase bevorzugt das 3'-Ende. Besonders bevorzugt sind Primer, die vollständig homolog zu einer Teilsequenz der Zielnukleotidsequenzen SEQ. ID. NO.1-5 sind (Beispiel 24).

Sondendefinition (inklusive Variationen): Unter einer Sonde wird ein Molekül verstanden, das wie die Primer an einem polymeren Grundgerüst eine Anzahl von Nukleotiden aufweist. Dabei wird ein Sondenkonstruktionsverfahren gemäß Patent US 5,210,015, verwendet, das bereits oben beschrieben wurde. Die Nukleinsäuresonden der vorliegenden Erfindung sind 18-30 Nukleobasen lang. Spezifische Sequenzen erhält man durch Aussuchen einer mindestens 18 Basen langen Sequenz aus den jeweiligen Matritzen (SEQ. ID. NO. 1-5, Beispiel 24). Erfindungsgemäß sind daher Sonden bevorzugt, die zu mindestens 90% homolog zu einem Teil der jeweiligen Matritzen (SEQ. ID. NO. 1-5) sind. Besonders bevorzugt sind Sonden mit strenger Homologie.

Definition von Homologie: Gegenstand der Erfindung sind Nukleotidsequenzen, die zu mindestens 80%, bevorzugt zu 90 %, am meisten bevorzugt zu 95% komplementär sind zu den Ziel-Nukleotidsequenzen SEQ. ID. NO. 1 bis 5 und 46 und 48.
Die Homologie (in %) ergibt sich aus der Anzahl an identischen Purin- bzw. Pyrimidinbasen in einer gegebenen Nukleotidsequenz.

Definition von Hybridisieren: Hybridisieren liegt dann vor, wenn die folgenden Verfahrensschritte vorliegen, bevorzugt die folgenden Bedingungen.
Die erfindungsgemäßen Primer und Sonden binden an komplementäre Basen bevorzugt an komplementäre Nukleotidsequenzen im Erbgut der Zielorganismen aus

der Gruppe Gesamtkeimzahl und an komplementäre Nukleotidsequenzen im Erbgut der Zielorganismen aus der Gruppe Leitkeime.
Darüber hinaus binden sie bevorzugt nicht an Nukleinsäure - Sequenzen, die für andere Mikroorganismen spezifisch sind.

Definition von Arzneimittel: Diese Substanzen sind die in den Monographien der EP beschriebenen Wirkstoffe, Rohstoffe, Hilfsstoffe, und Zubereitungen, die zur Anwendung in der Humanmedizin und Veterinärmedizin bestimmt sind.

Definition von Kosmetika: Diese Substanzen sind nicht in den Monographien der Pharmakapöen beschrieben, sondern unterliegen den Richtlinien der KOSVO und des LMBG. Sie umfassen Rohstoffe, Hilfsstoffe und Zubereitungen, die zur Anwendung an Menschen und Tieren bestimmt sind.

Definition von Mikroorganismus: Dieser Begriff umfaßt in erster Linie Organismen, die im menschlichen und tierischen Körper Krankheiten hervorrufen können und nur mikroskopisch wahrnehmbar sind. Sie sind in der Regel einzellig bzw. treten in lockeren Verbänden gleichartiger Zellen auf und werden aufgrund ihrer einfachen zellulären Organisation als Protisten bezeichnet. Ihre morphologischen und kulturell-biochemischen Merkmale, sowie ihre chemische Zusammensetzung, Antigen - Eigenschaften und genetischen Merkmale sind in der Literatur gut dokumentiert, z.B. in: Mikrobiologische Diagnostik, Burkhardt, 1992.

Definition von PCR-Reagenzien: PCR-Reagenzien sind Stoffe, die für eine PCR Reaktion mit maximaler Sensitivität und Spezifität notwendig sind, insbesondere DNA-Polymerase, Mg^{2+} Ionen wie z. B. $MgCl_2$, Kaliumsalze wie z.B. KCl , Additive wie z.B. Glycerin oder DMSO oder Formamid, Primer und Sonden, Desoxynukleotide, Puffersubstanz wie z. B. Tris-Base sowie optionale Zusätze in Form von passiven Fluoreszenzreferenz-Verbindungen wie z.B. das Fluoreszenzfarbstoff-Derivat ROX und z. B. 7-Deaza-2-deoxy-GTP als Ersatz von dGTP.

Definition von Komplementär: Komplementäre Strukturen entsprechen sich gegenseitig oder ergänzen sich. So sind zum Beispiel die Polynucleotid – Stränge der natürlichen DNA – Doppelhelix komplementär. Sie bilden zwei komplementäre Stränge aufgrund der spezifischen Basen – Paarung (A-T beziehungsweise G-C). Dadurch ist die Nucleotid – Sequenz im anderen Strang eindeutig festgelegt, zwar nicht identisch, aber komplementär. Ähnliches gilt für DNA – RNA – Hybride (mit A-U anstelle von A – T – Paaren). cDNA hat eine zu einer mRNA komplementäre Struktur. Bevorzugt ist eine

komplementäre Struktur, bei der (aa) die Sequenz des Forward-Primer und die Sequenz der Sonde oder (bb) die Sequenz der Sonde und des Reverse-Primers einer zuvor genannten Gruppe (i) bis (vii) alle beide komplementär zu den definierten Sequenzen sind. Mehr bevorzugt ist eine komplementäre Struktur, bei der die Sequenz des Forward-Primer, die Sequenz der Sonde und des Reverse-Primers einer zuvor genannten Gruppe (i) bis (vii) alle drei komplementär zu den definierten Sequenzen sind.

Verfahren

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen in Produkten, insbesondere Arzneimitteln oder Kosmetika, welches Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

a) Einsetzen von Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden mit den entsprechenden Sequenzen und deren Variationen,

(i) für *Staphylococcus aureus*
SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer

(ii) für *Pseudomonas aeruginosa*
SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer

(iii) für *Escherichia coli*
SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer

(iv) für *Salmonella ssp.*
SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer

(v) für Bakterien
SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer

(vi) für Enterobacteriaceae
SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer

(vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)
SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer

oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen SEQ ID NO 6 bis 49 sind,

b) Vervielfältigen der DNA mit PCR; und

c) Bestrahlung mit spezifischen Wellenlängen, die den Fluoreszenzfarbstoff anregen,

d) Messung und Quantifizierung der Emission des angeregten Fluoreszenzfarbstoffes.

Die Erfindung umfaßt ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die Herstellung der Sonden auf der TaqMan-Detektionstechnologie beruht.

Kern der Erfindung

Kern der Erfindung ist die Kombination bestimmter ausgewählter Sonden/Primer-Paare, die Mikroorganismen zufriedenstellend detektieren können. Die Optimierung der Sonden/Primer-Paare und der PCR Reaktionsbedingungen auf Sensitivität und Eignung zur GMP-konformen Produktprüfung nach EP, 2.6.12-13: Microbial contamination of products not required to comply with the test for sterility (1997) ist ebenfalls wesentlich. Dabei wird eine PCR-Technologie nach den US-Patenten US 4,800,159 und US 4,683,195 verwendet. Dabei findet insbesondere die TaqMan-Technologie Anwendung, die in dem US-Patent 5,210,015 beschrieben ist, welches am 11. Mai 1993 als Patent herausgegeben worden ist.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren oder dem erfindungsgemäßen Testkit handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der Fluoreszenz-PCR Technologie (TaqMan) für die oben genannten Zielmikroorganismen.

Vorteile:

Die erfindungsgemäßen Verfahren und die Testkits sind denen in der EP vorgeschriebenen Analysenmethoden in vielen Punkten weit überlegen (für Kosmetika wird z. Zt. noch keine vorgeschriebene Methode gefordert) und sollen diese, nach Validierung des Verfahrens mit dem jeweiligen Prüfprodukt, vollständig ersetzen. Die Möglichkeit, andere Analysenmethoden zu benutzen, wird in der EP (General Notices) explizit zugelassen, wenn sie die gleichen Ergebnisse wie die vorgeschriebenen Methoden ergeben.

Insbesondere hat das erfindungsgemäße Verfahren die folgenden Vorteile:

(A) Kit und Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen der Gruppe Gesamtkeimzahl :

Erstmals können durch Anwendung dieses Kits und Verfahrens ohne vorhergehende Kultivierung alle kontaminierenden Bakterien, deren Sequenz in der NIH Datenbase, USA, Stand 11.1997, beschrieben sind, analytisch bestimmt werden. Dabei werden lebende und nicht-vermehrungsfähige Bakterien quantitativ und sehr präzise mit einer Sensitivität von 1-3 Bakterien im Prüfprodukt erfaßt. Konsequenz der Anwendung ist eine deutliche erhöhte Produktsicherheit für den Verbraucher, da:

- Sporen und schwer kultivierbare Mikroorganismen, von denen eine Gesundheitsgefährdung ausgehen kann, erfaßt werden können,
- Nicht-vermehrungsfähige Mikroorganismen, die schwer nachweisbare Toxine enthalten, ebenfalls erfaßt werden können,
- Kontaminierende DNA bakterieller Herkunft , deren Abwesenheit zur Zeit schon in Biologicals und Produkten aus der rDNA-Technologie gezeigt werden muß, (EP,1997 und USP 1995) in allen Prüfprodukten einfach und effizient nachgewiesen werden kann.

Außerdem gibt es für die Anwendung keine besonderen Sicherheitsauflagen, da keine Komponenten des Kits einer Gefahrstoffverordnung unterliegen.

(B) Alle beanspruchten Kits und Verfahren:

- Die Anwendung hat ökonomische Vorteile für Verbraucher und Hersteller, da die bisherigen Verfahren um mehrere Tage zeitaufwendiger sind und häufig den zeitbestimmenden Schritt in der Freigabeanalytik darstellen. Schnelle Ergebnisse zur mikrobiologischen Sicherheit eines biologisch anfälligen Prüfprodukts führen zur Senkung der Kosten in Entwicklung und Produktion wie z.B. niedrigere Lagerhaltungskosten oder schnellerer Response auf variable Marktanfragen und damit insgesamt zur Senkung der Gestehungskosten, die in preiswertere Produkte einmünden.
- Die Anwendung hat ökologische Vorteile, da die Reduktion von Analysenzeit und Analysenmaterial (Plastik und Medien) die erheblichen Energiekosten deutlich erniedrigt.

Beispiele:

Die nachfolgenden Beispiele beschreiben die entwickelten PCR-Schnelltests zur Detektion der Zielmikroorganismen, inklusive aller Sequenzvariationen und Targetsequenzen:

(i)	*Staphylococus aureus*	(Beispiele 1-5)
(ii)	*Pseudomonas aeruginosa*	(Beispiele 6-9)
(iii)	*Escherichia coli*	(Beispiele 10-13)
(iv)	*Salmonella ssp.*	(Beispiele 14-17)
(iv)	Bakterien	(Beispiele 18-23)
(vi)	Target-Sonden-und Primersequenzen	(Beispiel 24)
(vii)	Sequenzvariationen	(Beispiel 25)
(viii)	(Entwicklungssequenzen Sonden und Primer mit nicht zufriedenstellender Testspezifität/Sensitivität	(Beispiel 26)

Beispiel 1

DNA-Freisetzung nach Voranreicherung

Je 100 µl-Aliquote der jeweiligen Mikroorganismen-Kultur wurde zur Freisetzung der DNS lysiert (Makino et al. Applied Environ. Microbiol. 3745-3747,1995). Die DNS wurde von Proteinen und sonstigen PCR-Inbibitoren gereinigt und dann in PCR Amplifikationsexperimenten eingesetzt.

Beispiel 2

Nachweis von *Staphylococcus aureus*

Der Nachweis von *S. aureus* erfolgte durch erfindungsgemäße artspezifische Amplifikation von cap-8 Gensequenzen (SEQ. ID. NO. 1, siehe Beispiel 24). Das cap-8 Gencluster verschlüsselt Proteine, die bei der Biosynthese der Kapsel von S. aureus beteiligt sind. Die Kapsel umhüllt die Oberfläche dieser Bakterien und stellt einen Schutzmechanismus gegen die Abwehrmechanismen der Wirtsorganismen dar. Die molekulare Zusammensetzung der Kapsel ist für *S. aureus* spezifisch und stellt sozusagen einen molekularen Fingerabdruck dieser Staphylococcen-Art dar. Der (open reading frame O) ORF-O des cap-8 Genclusters ist in den verschiedenen Serotypen von *S. aureus* konserviert (Sau und Lee 1996, J. Bacteriol. 178, 2118-2126). Die DNA-Sequenzen aus dem ORF-O des cap-8 Genclusters (SEQ. ID. NO. 1) wurden als diagnostische DNA-Sequenzen zur Synthese von artspezifischen DNA-Primern und Sonden ausgewählt.

Als Resultat von DNA-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischen Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende cap-8 spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

1. PCR-Sonde

20 mer 5'-TAMRA- CCT GGT CCA GGA GTA GGC GG 3' - FAM

(Sonde cap-8 # 15460*, als reverse complement einsetzen) [SEQ. ID. NO. 7] Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

2. PCR-Primer

24 mer: 5' -AGA TGC ACG TAC TGC TGA AAT GAG -3'

(Primer cap-8 forward # 15297*) [SEQ. ID. NO. 6]

26 mer: 5' -GTT TAG CTG TTG ATC CGT ACT TTA TT - 3'

(Primer cap-8 reverse # 15485* als reverse complement einsetzen) [SEQ. ID. NO. 8]

*Die Positionen beziehen sich auf die in der von Sau and Lee (1996, J. Bacteriol. 178, 2118-2126) publizierten cap-8 DNS Sequenz.

Synthese und Reinigung der PCR Primer Oligonukleotide erfolgte durch die Firma PE Applied Biosystems und nach deren Protokollen.

Beispiel 3

PCR-Bedingungen für den Nachweis von *Staphylococcus aureus*

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und $MgCl_2$ Konzentration ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

Alle Komponenten wurden von der Firma PE Applied Biosystems, Weiterstadt, bezogen. Herstellung der TaqMan-PCR-Reaktionsgemische, Durchführung der PCR Reaktionen und Bedienung der PCR Heizblocks bzw. des Fuoreszenz-Detektors (PE ABD Modell 7700 oder Modell LS50B) erfolgte nach Anweisungen des Geräteherstellers (User's Manual, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, PE Applied Biosystems 1997, bzw. Users Manual, PE ABI LS50 B).

Folgende Komponenten wurden in einem PCR Reaktionsgefäß (PE Applied Biosystems Best. Nr. N8010580) gemischt:

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration (in 50 µl)	Menge
DNA	5.00		1 fg - 100 ng
Bidest	10.25		
10 fach konzentrierter TaqMan Puffer A*	5.00	1 x	
25 mM MgCl2 Lösung	8.00	4 mM	
DATP	2.00	200 mM	
DCTP	2.00	200 µM	
DGTP	2.00	200 µM	
DUTP	2.00	400 µM	
5' Primer # 15297	5.00		15 pmol
Sonde # 15460	3.00		6 pmol
3' Primer # 15485	5.00		15 pmol
Ampli Taq Gold*	0.25		1.25 units
AmpErase UNG*	0.50		0.50 units
Gesamtvolumen	50.00		

* (aus: TaqMan PCR Core Reagents, N 8080229, PE Applied Biosystems)

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist darauf zu achten, daß bei jedem PCR-Lauf möglichst viele Komponenten des PCR-Mixes in einem sogenannten Mastermix vorgemischt werden. Unter Standardbedingungen wird nur das zu untersuchende DNA-Material (0 -15.25 µl) als Komponente in jedes PCR Reaktionsgefäß separat zugeben.

Die PCR-Reaktionen werden in dem PCR Heizblock des ABI Sequence Detectors 7700 durchgeführt. Funktional äquivalent sind PCR-Heizblöcke mit vergleichbaren Heiz- und Wärmetransfereigenschaften, wie z. B. die PE ABI Geräte Modell 7200, 9700, 9600 und 2400. Das PCR-Zyklusprofil ist wie folgt:

Cycle	**Temperatur (°C)**	**Zeit (min)**	**Wieder-holungen**
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
Cycle	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Für detaillierte Erklärungen zum PCR-Zyklus-Profil siehe: User's Manual, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, PE Applied Biosystems 1997.

Beispiel 4

Selektivität des *S. aureus* PCR-Schnelltests

4.1 Elektrophoretische Analyse

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im PCR Test eingesetzt (Abb. 1, Sambrock et al. 1993). Die entstandenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch analysiert. Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 213 Basenpaaren. Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierte, daß es sich um *cap8-0* DNA handelte (ohne Abb.)

Die DNA (10 ng pro Spur, 2-14) aller eingesetzten *S. aureus* Stämme (Lane 2-5) wurde von den *cap8-0* Primern (# 15297 und # 15485) detektiert. Dem gegenüber wurde die DNA einer nahe verwandten *Staphylococcus* Art, *S. epidermidis* (Lane 6) und die anderer bakterieller Gattungen (Lane 7-11) nicht detektiert. DNA aus Pilz, Fisch und Mensch (Lane 12-14) wurden als Kontrollen eingesetzt und ergaben kein Detektionssignal. NTC (= no template control) ist die Wasserkontrolle, in der keine DNA eingesetzt wurde.

4.2 Fluoreszenzanalyse

Neben der elektrophoretischen Analyse wurde die Selektivität der diagnostischen PCR als TaqMan-Fluoreszenztest unter Verwendung der oben genannten Primer und Fluoreszenzsonde bestimmt. Die Resultate sind als C_t-Werte (Threshold cycle) angegeben.

C_t-Wert: Die bei der TaqMan-PCR stattfindende Hydrolyse der Fluoreszenzsonde führt zu einem Anstieg der Reporterfluoreszenzstrahlung von einem PCR-Zyklus zum Nächsten. Die Zyklenzahl, bei der erstmals die Reporterfluoreszenzstrahlung über der Hintergrundstrahlung (NTC) des Systems liegt und linear ansteigt, wird "Threshold cycle" (C_t) genannt. (Hintergrundstrahlung (NTC) ist die Reporterfluoreszenzstrahlung in PCR Kontrollreaktionen, in denen keine Template-DNA eingesetzt wurde.) Sowohl die Menge an freiwerdender Reporterstrahlung als auch der "Treshold cycle" (C_t-Schwellenwert-Zykluszahl) sind proportional zu der Menge an entstehenden PCR Produkten und somit zu der Menge an eingesetzten Genkopien (Keimzahl).

Je mehr Genkopien eingesetzt werden, desto niedriger ist der resultierende C_t-Wert. In einem PCR - System mit 100%iger Effizienz nimmt der C_t- Wert mit jeder Verdopplung der Start-Genkopienzahl um einen Zyklus ab. Bei einer PCR-Reaktion die z.B. 40 Zyklen umfaßt, und bei der kein PCR Produkt entsteht, wird der C_t-Wert per Definition 40 sein.

Es werden je 10 ng an Template-DNA in den PCR-Reaktionen für den Spezifizitätstest eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen sind in Beispiel 3 angegeben.

Liste der getesteten DNA-Isolate

(je 10 ng genomische DNS analysiert)

Organismus	**Resultat** (als CT-Wert)
***Staphylococcus aureus* Arten**	
S. aureus	
DSM 683 (ATCC 9144)	17
DSM 1104 (ATCC 25923)	17
DSM 6148	17
DSM 346 (ATCC 6538)	17
S. epidermidis	
DSM 1798 (ATCC 12228)	40
Andere bakterielle Gattungen	
Organismus	**Resultat** (als CT-Wert)
Pseudomonas aeruginosa	
DSM 1117 (ATCC 27853)	40
DSM 1128 (ATCC 9027)	40
DSM 3227 (ATCC 19429)	40
DSM 50071 (ATCC 10145)	40
Salmonella typhimurium	
DSM 5569 (ATCC 13311)	40
Streptococcus faecalis	
DSM 2981 (ATCC 14506)	40
(reclassified DSM 2570 (ATCC 29212)	40
as *Enterococcus faecalis*)	
DSM 6134	40
Escherichia coli	
DSM 787 (ATCC 11229)	40
DSM 1576 (ATCC 8739)	40
Eukaryonten	
Neurospora crassa	40
Mensch (Perkin Elmer ABI, 401846)	40
Salmon (Sigma D 9156)	40
Wasser	40

Nach etwa 17 Zyklen wurde erstmals ein linearer Anstieg der FAM-Fluoreszenz über der FAM-Hintergrundstrahlung der Fluoreszenzsonde detektiert, wenn *S. aureus* genomische DNA in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt wurde. Wurde DNS von *S. epidermidis* in der PCR angesetzt, einer nahe verwandten Art von *S. aureus* innerhalb der Gattung *Staphylococcus*, so ließ sich kein signifikanter Anstieg der FAM-Reporterfluoreszenz detektieren.

Die Ergebnisse der PCR-Analyse mit DNA aus verschiedenen bakteriellen Gattungen, *Staphylococcus*-Arten und *Staphylococcus aureus* Stämmen zeigt die Spezifität des entwickelten *S. aureus* Tests. Nur *S. aureus* DNS wurde von den *cap-8* Primern und Sonden detektiert.

Beispiel 5

Sensitivität des *S. aureus* Nachweisverfahrens

Um die Sensitivität des *S. aureus* PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische *S. aureus* DNA präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt.

10 fg genomische *S. aureus* DNA entsprechen 3 Genomen (Strauss and Falkow 1997, *Science* 276, 707-712).

10	fg	=	3 KBE
10	pg	=	3.000 KBE
10	ng	=	3.000.000 KBE

Verschiedene Mengen an *S. aureus* DNA (1 fg bis 100 ng) wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 2). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wurde als CT-Wert angegeben.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNA von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten *S. aureus* Genome über 5 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 300.000 KBE (1ng DNS).

Beispiel 6

Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*

Der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte durch erfindungsgemäße artspezifische Amplifikation von *algQ*-Gensequenzen (Sequenzen s. Beispiel 24). Das *algQ*-Gen verschlüsselt Elemente eines Schutzmechanismus der von Pseudomonas aeruginosa im Laufe der Evolution entwickelt wurde, und der für diese Bakterienart spezifisch ist.

Die Produktion von Alginat ist eine einzigartige Virulenzeigenschaft von Pseudomonas aeruginosa. Alginat ist ein Polymer aus Mannuron- und Guluronsäure (1,4 glykosidisch verknüpft). Dieses Polymer bildet eine viskoses Gel auf der Bakterienoberfläche. Die Produktion dieses Biogels ist sehr sensitiv reguliert. Die Fähigkeit, Alginat zu synthetisieren, ist bei allen Pseudomonas aeruginosa Stämmen vorhanden. Sie ist charakteristisch für diese Bakterienart. Alginat-Synthese ist ein energiekonsumierender

Prozeß und deshalb reguliert. Ein Gen, das Alginat-Synthese reguliert, ist das *algQ* - Gen (Konyecsni and Deretic 1990, J. Bacteriol. 172, 2511-2520). Es verschlüsselt die sensorische Komponente eines Signaltransduktions-Systems (Roychoudhury et al. 1993, PNAS USA 90: 965-969). Da das *algQ*- Gen an der Regulation eines spezifischen Schutzmechanismus beteiligt ist, stellt es einen genetischen Marker mit diagnostischer Potenz zur Identifizierung der Art *Pseudomonas aeruginosa* dar.

Als Resultat von DNA-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischen Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende *algQ*-spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

1. PCR-Sonde :
26 mer: 5'-FAM - **CCA ACG CCG AAG AAC TCC AGC ATT TC** - TAMRA
(Sonde *algQ* # 911): [SEQ. ID. NO. 10]

Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

2. PCR-Primer:
23 mer: 5'-**CTT CGA TGC CCT GAG CGG TAT TC**-3'
(Primer *algQ* forward # 876*) [SEQ. ID. NO. 9]

Reverse Primer Sequence (# 1147):
23 mer: 5'-**CTG AAG GTC CTG CGG CAA CAG TT**-3'
(Primer *algQ* reverse # 1147* als reverse complement einsetzen) SEQ. ID. NO. 11

* Positionen beziehen sich auf die in Konyecsni and Deretic 1990, J. Bacteriol. 172, 2511-2520 publizierte DNA-Sequenz.
Synthese und Reinigung der PCR Primer Oligonukleotide erfolgte durch die Firma PE Applied Biosystems und nach deren Protokollen.

Beispiel 7

PCR-Bedingungen für den Nachweis von *P. aeruginosa*

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und $MgCl_2$ Konzentration ergaben such folgende Bedingungen als optimal:

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration (in 50 µl)	Menge DNA
	5.00		1 fg - 100 ng
Bidest	7.25		
10 x TaqMan Puffer A	5.00	1 x	
25 mM MgCl2 Lösung	13.00	6.5 mM	
dATP	2.00	200 µM	
dCTP	2.00	200 µM	
dGTP	2.00	200 µM	
dUTP	2.00	400 µM	
5' Primer # 876	1.00		3 pmol
Sonde # 911	4.00		8 pmol
3' Primer # 1147	5.00		15 pmol
AmpliTaq Gold	0.25		1.25 units
AmpErase UNG	0.50		0.50 units
DMSO	1,00		
	50.00		

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist darauf zu achten, daß bei jedem PCR-Lauf möglichst viele Komponenten des PCR-Mixes in einem sogenannten Mastermix vorgemischt werden. Unter Standardbedingungen wird nur das zu untersuchende DNA-Material (0-15.25 µl) als Komponente in jedes PCR Reaktionsgefäß separat zugeben.

Die PCR-Reaktionen werden in dem PCR Heizblock des ABI Sequence Detectors 7700 durchgeführt. Funktional äquivalent sind PCR-Heizblöcke mit vergleichbaren Heiz- und Wärmetransfereigenschaften, wie z. B. die PE ABI Geräte Modell 7200, 9700, 9600 und 2400.

Das PCR-Zyklenprofil für die *Pseudomonas aeruginosa* PCR ist wie folgt:

Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholungen
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	97	0:30	4
	60	1:00	
Cycle	94	0:30	41
	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Für Details zu PCR-Bedingungen siehe Beispiel 3.

Beispiel 8

Selektivität des *Pseudomonas aeruginosa* PCR-Schnelltests

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im Fluoreszenz-PCR Test eingesetzt. Die Menge an entstandenen PCR Produkten wurde als CT-Wert (Threshold Cycle, für C_t-Wert s. Definition Beispiel 4) angegeben .

Liste der getesteten DNA-Isolate
(je 10 ng genomische DNS analysiert)

Organismus		**Resultat** (als CT-Wert)
Pseudomonas Arten		
P. aeruginosa	DSM 1117 (ATCC 27853)	19
	DSM 1128 (ATCC 9027)	19
	DSM 3227 (ATCC 19429)	19
	DSM 50071 (ATCC 10145)	19
P. putida	DSM 50026	45
P. fluoreszenz	ATCC 948	45
Andere bakterielle Arten		
Staphylococcus aureus	DSM 683	45
	DSM 1104	45
	DSM 6148	45
	DSM 6538P	45
Streptococcus faecalis	DSM 2981	45
	DSM 6134	45
	ATCC 29212	45
Salmonella typhimurium	ATCC 13311	45
Escherichia coli	DSM 301	45
	DSM 787	45
	DSM 1103	45
	ATCC 8739	45
Eukaryonten		
Neurospora crassa		45
Arabidopsis thaliana		45
Salmon (Sigma D9156)		45
Mensch (Perkin Elmer ABI, 401846)		45
Wasser		45

Ausschließlich *Pseudomonas aeruginosa* Stämme ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Schnelltest. Nach 19 PCR Zyklen (CT=19) war erstmals ein linearer Anstieg der Fluoreszenz meßbar, wenn 10 ng *P. aeruginosa* DNS eingesetzt wurden. Der PCR Test

war hochspezifisch. Auch die nahe verwandten Arten *P. putida* und *P. fluoreszenz* ergaben kein Fluoreszenzsignal im PCR-Schnelltest.

Als Positivkontrolle wurden die selben bakteriellen DNS, die im algQ-PCR-Test analysiert worden waren mit dem universellen 16S rRNA PCR System (s. Beispiel 19) untersucht. Alle bakteriellen DNS ergaben ein positives Signal mit dem 16S rRNA System. Das bedeutet, alle DNS ließen sich 16S rRNA-PCR-amplifizieren, aber lediglich die *P. aeruginosa* DNS ließen sich *algQ*-PCR-amplifizieren.

Das *algQ*-System ist *Pseudomonas aeruginosa* spezifisch.

Zusätzlich wurden die entstandenen PCR-Produkte elektrophoretisch analysiert (vgl. Beispiel 3). Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 294 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierte, daß es sich um *algQ* DNS handelte (ohne Abb.)

Beispiel 9

Sensitivität und Linearität des *P. aeruginosa* PCR-Schnelltests

Um die Sensitivität des *P. aeruginosa* PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische *P. aeruginosa* DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt (Abb.3). Verschiedene Mengen an *P. aerugonosa* Genomkopien wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 3). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wird als CT-Wert angegeben. Die PCR- Reaktion wurde über 45 Zyklen durchgeführt. Der CT-Wert der Wasserkontrolle (NTC = no template control) betrug 45.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten *P. aeruginosa* Genome über 4 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 30.000 KBE.

Beispiel 10

Nachweis von *Escherichia coli*

Der Nachweis von *E. coli* erfolgte durch erfindungsgemäße artspezifische Amplifikation von *mur*A-Gensequenzen

Spezifische Bereiche des *murA*-Gens dienten als diagnostisches Ziel für die Entwicklung eines PCR-Schnelltests zum Nachweis von *Escherichia coli.* Warum wurde dieses Gen als diagnostisches Ziel gewählt? Das *murA* Gen verschlüsselt das Enzym UDP-N-Acetylglucosamin Enolpyruvyltransferase, ein wichtiges Strukturgen von *E. coli* (Marquardt et al. 1992, J. Bacteriol. 174, 5748-5752). Dieses Enzym katalysiert den ersten Schritt der Peptidoglykan-Synthese, im Falle von E. coli des Mureins, welches

einen essentiellen Bestandteil der bakteriellen Zellwand darstellt. Die Zellwandkomposition ist als ein charakteristisches Merkmal von Bakterienarten anzusehen. Es wurde die *murA* Nukleotidsequenz von *E. coli* mit der nahe verwandten Enterobakteriaceaen-Art *Enterobacter cloacae* verglichen. Auf Grund der identifizierten Sequenzunterschiede wurde das *murA*-Gen als genetischer Marker mit diagnostischer Potenz zur Identifizierung der Enterobakteriaceaen-Art *Escherichia coli* ausgewählt.

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende *murA*-spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

Forward Primer Sequence (# 767*):
5' **GTT CTG TGC ATA TTG ATG CCC GCG** 3' [SEQ. ID. NO. 12]

Sonde (# 802):
5'-FAM - **TCT GCG CAC CTT ACG ATC TGG TT** - TAMRA 3' [SEQ. ID. NO. 13]

Reverse Primer Sequence (# 884):
5' **GCA AGT TTC ACT ACC TGG CGG TTG** 3'
(als reverse complement einsetzen) [SEQ. ID. NO. 14]

* Positionen beziehen sich auf die in Marquardt et al. 1992, J. Bacteriol. 174, 5748-5752 publizierte DNA-Sequenz (Genbank: M92358).

Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

Beispiel 11

PCR-Bedingungen für den Nachweis von *Escherichia coli*

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, der $MgCl_2$ bzw. Glycerin Konzentration und der Nukleotidkomposition ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration (in 50 µl)	Menge
DNA	5.00		1 fg - 100 ng
Bidest	8.75		
10 x TaqMan Puffer A	5.00	1 x	
25 mM MgCl2 Lösung	7.00	3.5 mM	
dATP	2.00	200 µM	
dCTP	2.00	200 µM	
7-deaza-dGTP	2.00	200 µM	
dUTP	2.00	400 µM	
Glycerin 40%	2.50	2%	
5' Primer # 767	5.00		15 pmol
Sonde # 802	3.00		6 pmol
3' Primer # 884	5.00		15 pmol
AmpliTaq Gold	0.25		1.25 units
AmpErase UNG units	0.50		0.50
	50.00		

Das PCR-Zyklenprofil für die *Escherichia coli* PCR:

Cycle	Temperatur (C°)	Zeit (min)	Wiederholung
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Für Details siehe Beispiel 3.

Beispiel 12

Selektivität des *Escherichia coli* PCR-Schnelltests

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im Fluoreszenz-PCR Test eingesetzt. Die Menge an entstandenen PCR Produkten wurde als CT-Wert (Threshold Cycle) angegeben (Tab.).

Liste der getesteten DNA-Isolate

(je 10 ng genomische DNS analysiert)

Organismus		Resultat (als CT-Wert)
Escherichia coli Stämme		
Escherichia coli		
DSM 301		16
DSM 787		16
DSM 1103		16
ATCC 8739		16
Andere Enterobacteriaceae		
Acetobacter pasteurianus	DSM 3509	40
Acinetobacter calcoaceticus	DSM 6962	40
Aeromonas enteropelogenes	DSM 6394	40
Alcaligenes faecalis	DSM 30030	40
Budvicia aquatica	DSM 5075	40
Buttiauxella agrestis	DSM 4586	40
Cedecea davisae	DSM 4568	40
Chromobacterium violaceum	DSM 30191	40
Enterobacter cloacae	DSM 30054	40
Edwardsiella tarda	DSM 30052	40
Ewingella americana	DSM 4580	40
Erwinia amylovora	DSM 30165	40
Hafnia alvei	DSM 30163	40
Haemophilus influenzae	DSM 4690	40
Halomonas elongata	DSM 2581	40
Helicobacter pylori	DSM 4867	40
Kluyvera ascorbata	DSM 4611	40
Leclercia adecarboxylata	DSM 5077	40
Legionella pneumophilia	DSM 7515	40
Leminorella grimontli	DSM 5078	40
Levinea malonatica	DSM 4596	40
Listeria monocytogenes	DSM 20600	40
Moellerella wisconsensis	DSM 5076	40
Morganella morganii sp.	DSM 30164	40
Pantoea agglomerans	DSM 3493	40
Photorhabdus luminescens	DSM 3368	40
Plesiomonas shigelloides	DSM 8224	40
Pragia fontium	DSM 5563	40
Providencia stuarti	DSM 4539	40
Proteus mirabilis	DSM 788	40
Rhanella aquatilis	DSM 4594	40
Serratia marcescens	DSM 30121	40
Tatumella ptyseos	DSM 5000	40
Vibrio proteolyticus	DSM 30189	40
Xenorhabdus nematophilus	DSM 3370	40
Yersinia enterocolitica	DSM 4780	40
Andere bakterielle Arten		
Pseudomonas aeruginosa	DSM 1128 (ATCC 9027)	40
Bacillus subtilis		40

Salmonella typhimurium	ATCC 13311	40
Pseudomonas mirabelis	DSM 788	40
Staphylococcus aureus	DSM 6538P	40
Streptococcus faecalis	DSM 2981	40
Klebsiella pneumonia	ATCC 10031	40
Citrobacter freundii	DSM 30040	40
Eukaryonten		
Neurospora crassa		40
Arabidopsis thaliana		40
Salmon (Sigma D9156)		40
Mensch (Perkin Elmer ABD, 401846)		40
Wasser		40

Lediglich *Escherichia coli* Stämme ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Schnelltest. Nach 16 PCR Zyklen (CT=16) war erstmals ein linearer Anstieg der Fluoreszenz meßbar, wenn 10 ng *Escherichia coli* DNS eingesetzt wurden. Der PCR Test war hochspezifisch. Auch ein nahe verwandte Enterobacteriaceaen-Art, *Enterobacter cloacae,* ergab kein Fluoreszenzsignal im PCR-Schnelltest (Tab.).

Als Positivkontrolle wurden dieselben bakteriellen DNS, die im *murA*-PCR-Test analysiert worden waren (Tab.) mit dem universellen 16S rRNA PCR System (s. Beispiel 19) untersucht. Alle bakteriellen DNS ergaben ein positives Signal mit dem 16S rRNA System. D. h. alle DNS ließen sich 16S rRNA-PCR-amplifizieren, aber lediglich die *Escherichia coli* DNS ließen sich *murA*-PCR-amplifizieren.

Das *murA*-System ist spezifisch für *Escherichia coli.*

Zusätzlich wurden die entstandenen PCR-Produkte elektrophoretisch analysiert (vgl. Bericht *Staphylococcus aureus*). Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 142 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierten, daß es sich um *murA* DNS handelte (ohne Abb.)

Beispiel 13

Sensitivität des *E. coli* Test

Um die Sensitivität des *Escherichia coli* PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische *Escherichia coli* DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt (Abb. 4).

Verschiedene Mengen an *Escherichia coli* Genomkopien wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 4). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wird als CT angegeben. Die PCR Reaktion wurde über 40 Zyklen durchgeführt. Der CT-Wert der Wasserkontrolle (NTC = no template control) betrug 40.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten *Escherichia coli*-Genome über 6 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 3.000000 KBE.

Beispiel 14

Nachweis von *Salmonella ssp.* (Subspezies)

Der Nachweis von *Salmonella spp.* der Art *Salmonella enterica* erfolgte durch erfindungsgemäße spezifische Amplifikation von *invA*-Gensequenzen

Spezifische Bereiche des *invA* Gens dienten als diagnostisches Ziel für die Entwicklung eines PCR-Schnelltests zum Nachweis von *Salmonella spp.* Warum wurde dieses Gen als diagnostisches Ziel gewählt? Das *invA* Gen verschlüsselt einen Salmonella-spezifischen Virulenzfaktor. Verschiedene Untersuchungen an einer Reihe von Salmonellen haben gezeigt, daß diese Bakterienarten an Epithelzellen binden. Bei diesem Prozeß wird das Actin-System der Wirtszellen von den Bakterien beeinflußt. Als Reaktion umschließen die Wirtszellen die Bakterienzellen. Nach vollständigem Einschluß existieren die Bakterien in Vesikeln im Zytoplasma der Wirtszellen. An diesem Einschließungsprozeß (engl. invasion) sind die sogenannten *inv* Gene (*invA-H*) von *Salmonella* beteiligt. Mutanten in dem *invA* Gen binden noch an Wirtszellen, werden von diesen aber nicht mehr aufgenommen. Die *inv* Gensequenz *Salmonella* Subspezies stark konserviert erhalten (Salyers and Whitt 1994, Salmonella Infection, in: Bacterial Pathogenesis ASM Press, Washington D.C. p233). Das *invA* Gen von Salmonella wurde isoliert und die Nukleotidsequenz aufgeklärt (Galan and Curtis 1989, PNAS USA 86: 6383-7, Galan and Curtis 1991, Infection and Immunity 59: 2901-2908, und siehe: Rahn et al. 1992, Mol. Cell. Probes 6: 271-279). Da das *invA* Gen an der Expression eines spezifischen Virulenzmechanismus von Salmonellen beteiligt ist, stellt es einen genetischen Marker mit diagnostischer Potenz zur Identifizierung von *Salmonella ssp.* dar (Rahn et al. 1992, Mol. Cell. Probes. 6: 271-279).

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende *invA*-spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

Forward Primer Sequence (# 269*):

5' **GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC** 3' [SEQ. ID. NO. 15]

Sonde (# 333):

5'-FAM - **CTT CTC TAT TGT CAC CGT GGT CCA** - TAMRA 3' [SEQ. ID. NO. 16]

Reverse Primer Sequence (# 542):

5' **GGT TCC TTT GAC GGT GCG ATG AAG** 3' (als reverse complement einsetzen) [SEQ. ID. NO. 17]

* Positionen beziehen sich auf die in Boyd et al. 1996, Appl. Environ. Microbiol. 62: 804-808 publizierte DNA-Sequenz (Genbank: U43237).

Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert wurden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

Beispiel 15

PCR-Bedingungen für den Nachweis von Salmonellen

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und $MgCl_2$ Konzentration ergaben such folgende Bedingungen als optimal:

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration (in 50 µl)	Menge
DNA	5.00		1 fg - 100 ng
Bidest	11.25		
10 x TaqMan Puffer A	5.00	1 x	
25 mM MgCl2 Lösung	7.00	3.5 mM	
dATP	2.00	200 µM	
dCTP	2.00	200 µM	
dGTP	2.00	200 µM	
dUTP	2.00	400 µM	
5' Primer # 269	5.00		15 pmol
Sonde # 333	3.00		6 pmol
3' Primer # 542	5.00		15 pmol
AmpliTaq Gold	0.25		1.25 units
AmpErase UNG	0.50		0.50 units
	50.00		

Das PCR-Zyklenprofil für die *Salmonella ssp.* PCR:

Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholung
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Für Details siehe Beispiel 3.

Beispiel 16

Selektivität des *Salmonella ssp.* PCR-Schnelltests

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im Fluoreszenz-PCR Test eingesetzt. Die Menge an entstandenen PCR Produkten wurde als CT-Wert (Threshold Cycle) angegeben (CT- Definition s. Beispiel 4).

Liste der getesteten DNA-Isolate

(je 10 ng genomische DNS analysiert)

Organismus		**Resultat** (als CT-Wert)
Salmonella enterica		
Subspezies		
Salmonella typhimurium	ATCC 13311	15
Salmonella typhi		15
Salmonella agona		15
Salmonella borismorbificans		15
Salmonella anatum		15
Salmonella brandenburg		15
Salmonella derby		15
Salmonella montevideo		15
Salmonella newport		15
Salmonella parathyphi B		15
Salmonella pullorum		15
Salmonella dublin		15
Salmonella enteritidis		15
Salmonella hadar		15
Salmonella infantis		15
Andere bakterielle Arten		
Pseudomonas aeruginosa	DSM 1117 (ATCC 27853)	40
	DSM 1128 (ATCC 9027)	40

	DSM 3227 (ATCC 19429)	40
	DSM 50071 (ATCC 10145)	40
Pseudomonas mirabelis	DSM 788	40
Staphylococcus aureus	DSM 683	40
	DSM 1104	40
	DSM 6148	40
	DSM 6538P	40
Streptococcus faecalis	DSM 2981	40
	DSM 6134	40
	ATCC 29212	40
Escherichia coli	DSM 301	40
	DSM 787	40
	DSM 1103	40
	ATCC 8739	40
Enterobacter cloacae	DSM 30054	40
Klebsiella pneumonia	ATCC 10031	40
Citrobacter freundii	DSM 30040	40
Eukaryonten		
Neurospora crassa		40
Arabidopsis thaliana		40
Salmon (Sigma D9156)		40
Mensch (Perkin Elmer ABD, 401846)		40
Wasser		40

Lediglich Salmonellen ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Schnelltest. Nach 15 PCR Zyklen (CT=15) war erstmals ein linearer Anstieg der Fluoreszenz meßbar, wenn 10 ng *Salmonella ssp.* DNS eingesetzt wurden. Der PCR Test war hochspezifisch. Auch die nahe verwandten *Escherichia coli* Stämme ergaben kein Fluoreszenzsignal im PCR-Schnelltest .

Als Positivkontrolle wurden dieselben bakteriellen DNS, die im *invA*-PCR-Test analysiert worden waren mit dem universellen 16S rRNA PCR System untersucht. Alle bakteriellen DNS ergaben ein positives Signal mit dem 16S rRNA System. D. h. alle DNS ließen sich 16S rRNA-PCR-amplifizieren, aber lediglich die *Salmonella* DNS ließen sich invA-PCR-amplifizieren.

Das *invA*-System ist spezifisch für *Salmonella.*

Zusätzlich wurden die entstandenen PCR-Produkte elektrophoretisch analysiert. Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 287 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierten, daß es sich um *invA* DNS handelte (ohne Abb.)

Beispiel 17

Sensitivität des PCR-Schnelltests

Um die Sensitivität des *Salmonella ssp.* PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische *Salmonella typhimurium* DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt (Abb. 5).

Verschiedene Mengen an *Salmonella typhimurium* Genomkopien wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 5). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wird als CT angegeben. Die PCR Reaktion wurde über 40 Zyklen durchgeführt. Der CT-Wert der Wasserkontrolle (NTC = no template control) betrug 40.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten *Salmonella typhimurium* Genome über 6 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 3.000000 KBE.

Beispiel 18

DNA-Freisetzung ohne Voranreicherung in Nährmedien

DNS aus verschiedenen Testmikroorganismen wurde entsprechend Boom et al.,1990, extrahiert , von Proteinen und sonstigen PCR-Inhibitoren gereinigt (Quiagen Säulen Kit, 1995) und in PCR Amplifikationsexperimenten eingesetzt.

Beispiel 19

Nachweis von Bakterien universell

Der Nachweis von Bakterien erfolgte durch erfindungsgemäße spezifische Amplifikation von konservierten 16S rRNA Gensequenzen (SEQ. ID. NO. 5, siehe Beispiel 24). Bestimmte 16S rRNA-spezifische DNA-Sequenzen haben sich im Laufe der Evolution konserviert, sind deshalb im Genom aller Bakterien vorhanden und können als Primer und Sonden zum universellen Nachweis von Bakterien eingesetzt werden (Relman 1993, Weisburg et al.1991, J. Bacteriol. 173).

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischen Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende 16S rRNA-spezifische DNA-Sequenzen als optimales Primer-/SondenKombination bestimmt:

1. PCR Sonde

23 mer: 5'- FAM - **TTA AGT CCC GCA ACG AGC GCA AC** - TAMRA - 3'

(Sonde 16S rRNA # 1090): [SEQ. ID. NO. 19] Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

2. PCR Primer

19 mer: 5'- **GCA TGG CTG TCG TCA GCT C** - 3'

(Primer 16S rRNA forward # 1053*) [SEQ. ID. NO. 18]

20 mer: 5'- **TGA CGG GCG GTG TGT ACA AG** - 3'

(Primer 16S rRNA reverse # 1386*) [SEQ. ID. NO. 20]

* Positionen beziehen sich auf die DNS Sequenz des 16S rRNA Gens (E. coli in Weisburg et al.1991, J. Bacteriol. 173)

Synthese und Reinigung der PCR -Primer -Oligonukleotide erfolgte durch die Firma PE Applied Biosystems und nach deren Protokollen.

Beispiel 20

PCR Bedingungen für den Nachweis von Bakterien universell

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und $MgCl_2$ Konzentration Temperatur und Zyklenprofil der PCR und Abstand des Reporterfarbstoffs zum Quencherfarbstoff innerhalb der Sonde ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

Folgende Komponenten wurden in einem PCR Reaktionsgefäß (PE Applied Biosystems Best. No. N8010580) gemischt.:

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration (in 50 µl)	Menge
DNA	1.00		1 fg - 100 ng
Bidest Wasser	17.25		
10 x TaqMan Puffer A	5.00	1 x	
25 mM $MgCl_2$ Lösung	11.00	5.5 mM	
dATP	1.00	200 µM	
dCTP	1.00	200 µM	
dGTP	1.00	200 µM	
dUTP	1.00	400 µM	
5' Primer #1053	5.00	400 nM	20 pmol
Sonde #1090	1.00	40 nM	2 pmol
3' Primer #1386	5.00	400 nM	20 pmol
AmpliTaq	0.25		1.25 units
AmpErase UNG	0.50		0.50 units
	50.00		

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist darauf zu achten, daß bei jedem PCR-Lauf möglichst viele Komponenten des PCR-Mixes in einem sogenannten

Mastermix vorgemischt werden. Unter Standardbedingungen wird nur das zu untersuchende DNA-Material (0-15.25 µl) als Komponente in jedes PCR Reaktionsgefäß separat zugeben.

Das PCR-Zyklusprofil ist wie folgt:

Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholung
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
Cycle	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Dieses Schema ist kompatibel für PCR-Geräte mit Heizblock, wie z.B.: GeneAMP PCR Geräte 2400 und 9600 und das ABI Prism 7700 Sequence Detection System von Perkin Elmer. Für Details siehe Beispiel 3.

Nach Abschluß der PCR Reaktionen wurden die Proben in das Fluorimeter LS-50B, mit Zusatz zur Detektion von Fluoreszenz in Mikrotiterplatten der Firma Perkin Elmer transferiert. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt nach Angaben des Herstellers (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany).

Beispiel 21

Selektivität des universellen bakteriellen PCR-Schnelltests

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA von verschiedenen Organismen isoliert und in dem universellen PCR-Test eingesetzt (Abb. 6). Die Menge an entstandenen PCR-Produkten wird in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben (Abb. 6)

Der entwickelte PCR Test detektiert selektiv Bakterien.

Die unterschiedlichen Signalintensitäten der bakteriellen Proben reflektierten die eingesetzten variablen DNA-Mengen.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch analysiert. Die PCR Produkte hatten eine Größe von 330 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen dieser PCR-Produkte ergaben, daß es sich tatsächlich um 16S rRNA handelte (ohne Abb.). Der PCR-Schnelltest ist 16S rRNA-spezifisch.

Beispiel 22

Sensitivität und Linearität des Schnelltests zum Nachweis von Bakterien

Um die Sensitivität des PCR Tests zu bestimmen, wurde *Salmonella* DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt. Es wurden verschiedene Verdünnungen der DNS hergestellt. Jede Verdünnung wurde dreifach parallel hergestellt und in dem PCR-Test eingesetzt (Abb. 7). Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz wird als sogenannter RQ Wert angegeben.

Der RQ Wert ist die Differenz zwischen der Reporter-(R) Fluoreszenzstrahlung in einer PCR Reaktion, in der Template DNS (hier genomische Salmonella DNS) eingesetzt wurde (R^+) und der Reporter-Fluoreszenzstrahlung, in einer PCR-Reaktion, in der keine DNS eingesetzt wurde (R^-). R^- entspricht also der Hintergrundsstrahlung. Die Reporter-Strahlung (R) wird jeweils zur Quencher-Stahlung (Q) ins Verhältnis gesetzt. Die Quencher-Strahlung ändert sich während der PCR-Reaktion nicht und stellt somit einen internen Standard dar, gegen den normiert wird.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 1-3 *Salmonella* Bakterien mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen ließ. Die Fluoreszenzstrahlung, die nach 40 PCR Zyklen entsteht, liegt signifikant über der Hintergrundstrahlung.

Der Fluoreszenz-PCR-Test erlaubt die lineare Quantifizierung der eingesetzten Salmonella Genome über mindestens 4 log Stufen d. h. zwischen 1-3 und 30.000 KBE (Abb. 7).

Beispiel 23

Produktprüfung mit dem bakteriellen Schnelltest

Die Anwendung des entwickelten PCR-Schnelltests wurde durch *spiking* Experimente untersucht. 10 ml WFI (Wasser für Injektionszwecke, Chargen Nr. 63022) wurden mit 50 KBE Salmonellen gespikt (5 KBE/ml). DNS wurde aus den verschiedenen, gespikten Proben präpariert (Boom et al. 1990), gereinigt (Qiagen 1995) und im PCR-Schnelltest analysiert (Abb. 8).

Die gespikten Salmonellen ließen sich im Prüfprodukt nachweisen. Die Nachweismenge betrug 90% der eingesetzten DNA-Menge (Abb. 8). Dieser Wert reflektiert die Materialverluste, die bei der DNS Präparation aus den gespikten Produkten auftreten. Trotz dieser Verluste ließen sich 1-3 KBE/ml in dem gespikten Prüfprodukt nachweisen. Auf der anderen Seite waren im nicht-gespikten Prüfprodukts keine Salmonella Keime detektierbar (Abb. 8). Die Sterilität des Prüfprodukts wurde durch Membranfiltration entsprechend der Methoden in der EP (1997) nachgewiesen.

Beispiel 24

Target-Gen-, Primer- und Sondensequenzen für die verschiedenen Organismen / -gruppen

SEQ. ID. NO. 1 Staphylococcus aureus

5' AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAGCT AATGGAAAAC ACATATAGAG ACGTGAATAT TGCTTTAGCT AATGAATTAA CAAAAATTTG CAATAACTTA AATATTAATG TATTAGTTGT GATTGAAATG GCAAACAAAC ATCCGCGTGT TAATATCCAT CAACCTGGTC CAGGAGTAGG CGGTCATTGT TTAGCTGTTG ATCCGTACTT TATT 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

SEQ. ID. NO. 6 5' AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG 3'

SEQ. ID. NO. 7 5'- TAMRA - CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG - FAM -3' (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 8 5' GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT 3' (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 2 Pseudomonas aeruginosa

5' CAGGCCTTCG ATGCCCTGAG CGGTATTCAG GCACCGGCGC CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTCTGCC AATTGCTGCT GGACTATGTA TCTGCCGGAC ACTTCGAGGT CTACGAGCAA CTGACGGCGG AAGGCAAGGC CTTCGGCGAT CAGCGCGGCC TGGAGCTGGC CAAGCAGATC TTCCCCCGGC TGGAAGCCAT CACCGAATCC GCGCTGAACT TCAACGACCG CTGCGACAAC GGCGATTGCC GTGAAGGAGC CTGCCTCATC GCGGAGCTGA AGGTCCTGCG GCAACAGTTG CACGAACGCT 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

SEQ. ID. NO. 9 5' CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC 3'

SEQ. ID. NO. 10 5' - FAM - CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC - TAMRA - 3'

SEQ. ID. NO. 11 5' CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT 3' (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 3 Escherichia coli

5' AAAGTAGAAC GTAATGGTTC TGTGCATATT GATGCCCGCG ACGTTAATGT ATTCTGCGCA CCTTACGATC TGGTTAAAAC CATGCGTGCT TCTATCTGGG CGCTGGGGCC GCTGGTAGCG CGCTTTGGTC AGGGGCAAGT TTCACTACCT GGCGGTTGTA CGATCGGTGC GCGTCCGGTT GATCTACACA TTTCTGGCCT CGAACAATTA GGCGCGACCA TC 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

SEQ. ID. NO. 12 5' **GTTC TGTGCATATT GATGCCCGCG** 3'

SEQ. ID. NO. 13 5' - FAM - **TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT** - TAMRA - 3'

SEQ. ID. NO. 14 5' **GCAAGT TTCACTACCT GGCGGTTG** 3 (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 4 **Salmonella ssp.**

5' **TGATTGAAGC CGATGCCGGT GAAATTATCG CCACGTTCGG GCAATTCGTT ATTGGCGATA GCCTGGCGGT GGGTTTTGTT GTCTTCTCTA TTGTCACCGT GGTCCAGTTT ATCGTTATTA CCAAAGGTTC AGAACGTGTC GCGGAAGTCG CGGCCCGATT TTCTCTGGAT GGTATGCCCG GTAAACAGAT GAGTATTGAT GCCGATTTGA AGGCCGGTAT TATTGATGCG GATGCCGCGC GCGAACGGCG AAGCGTACTG GAAAGGGAAA GCCAGCTTTA CGGTTCCTTT GACGGTGCGA TGAAGTTTAT** 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

SEQ. ID. NO. 15 5' **GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC** 3'

SEQ. ID. NO. 16 5' - FAM - **CTTCTCTATT GTCACCGTGG TCCA** - TAMRA - 3'

SEQ. ID. NO. 17 5' **GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG** 3' (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 5 **Bakterien**

5' **GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTTGTGAAA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTATCCTT TGTTGCCAGC GGTCCGGCCG GGAACTCAAA GGAGACTGCC AGTGATAAAC TGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCAT CATGGCCCTT ACGACCAGGG CTACACACGT GCTACAATGG CGCATACAAA GAGAAGCGAC CTCGCGAGAG CAAGCGGACC TCATAAAGTG CGTCGTAGTC CGGATTGGAG TCTGCAACTC GACTCCATGA AGTCGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGA ATGCCACGGT GAATACGTTC CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCA** 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

(am Beispiel *E. coli*, Weisburg et al. 1991, J. Bakteriol. 173: 598.)

SEQ. ID. NO. 18 5' **GCATGGCTGT CGTCAGCTC** 3'

SEQ. ID. NO. 19 5' - FAM - **TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC** - TAMRA - 3'

SEQ. ID. NO. 20 5' **CTTGTACACA CCGCCCGTCA** 3' (als reverse complement einsetzen)

Beispiel 25

Varianten in den Primer- und Sondensequenzen.

Als Varianten werden die Primer- / Sondensequenzkombinationen definiert, die die Target-DNA-Sequenzen mit gleicher Spezifität (100%) und vergleichbarer Sensitivität (>70%) detektieren, wie die in Beispiel 24 angegebenen Sequenzen.

Forward Primer **Sonde** **Reverse Primer**

Staphylococcus aureus **(PCR-Bedingungen wie in Beispiel 3)**

[SEQ.ID.NO 6]AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG/[SEQ.ID.NO 7]TAMRA-CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG-FAM / [SEQ.ID.NO 8]GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT

[SEQ.ID.NO 6] AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG /[SEQ.ID.NO 7]TAMRA-CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG-FAM / [SEQ.ID.NO 23] CATTGTTTAGCTGT TGATCCGTAC T

[SEQ.ID.NO 24]GCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAG/[SEQ.ID.NO 7]TAMRA-CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG-FAM / [SEQ.ID.NO 8]GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT

Pseudomonas aeruginosa **(PCR-Bedingungen wie in Beispiel 7)**

[SEQ.ID.NO 9]CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 10]FAM-CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 11]CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 25]CAGGCCTTCG ATGCCCTGA GC /[SEQ.ID.NO 10]FAM-CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 11]CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 9]CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 10]FAM-CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 26]GCTGAAGGTCC TGCGGCAACA G

Escherichia coli **(PCR-Bedingungen wie in Beispiel 11)**

[SEQ.ID.NO 12]GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG/[SEQ.ID.NO 13]FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA/[SEQ.ID.NO 14]GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG

[SEQ.ID.NO 27]TAGAACGTAA TGGTTCTGTGC AT/[SEQ.ID.NO 13]FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA /[SEQ.ID.NO 14]GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG

[SEQ.ID.NO 12]GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG /[SEQ.ID.NO 13]FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA/[SEQ.ID.NO 28]CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG

[SEQ.ID.NO 27]TAGAACGTAA TGGTTCTGTGC AT/ [SEQ.ID.NO 13]FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA /[SEQ.ID.NO 28]CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG

Salmonella ssp (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 15)

[SEQ.ID.NO 15]GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC/[SEQ.ID.NO 16]FAM-CTTCTCTATTGTCACCGTGG TCCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17]GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 15]GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC / [SEQ.ID.NO 21] FAM-TT(T/C)GTTATTGGCGATAGCCTGGC-TAMRA /[SEQ.ID.NO 17] GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 15]GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC/[SEQ.ID.NO 22] TAMRA-TTCTCTGGATGGTATGCCCGGTA-FAM /[SEQ.ID.NO 17] GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

Bakterien (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 20)

[SEQ.ID.NO 18]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19]FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]CTTGTACACA CCGCCCGTCA

[SEQ.ID.NO 29]TGCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19]FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]CTTGTACACA CCGCCCGTCA

[SEQ.ID.NO 18]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 30]FAM-TTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]CTTGTACACA CCGCCCGTCA

Enterobacteriaceae (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 30)

Varianten in den Primer- und Sondensequenzen

[SEQ.ID.NO 44]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 46]FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45]TTTATGAGGT CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 50]GTGCTGCATG GCTGTCGTC / [SEQ.ID.NO 46]FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45]TTTATGAGGT CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 44]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 51]FAM-AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45]TTTATGAGGT CCGCTTGCTC

Beispiel 26

Fehlvarianten in den Primer- und Sondensequenzen.

Als Fehlvarianten werden die Primer- / Sondenkombinationen definiert, die die Target-DNA-Sequenzen mit nicht zufriedenstellender Spezifität (<100%) und Sensitivität (<70%) detektieren, wie die in Beispiel 24 angegebenen Sequenzen.

vgl. Figur mit Primern und Sonden

Forward Primer	Sonde	Reverse Primer

Staphylococcus aureus **(PCR-Bedingungen wie in Beispiel 3)**

[SEQ.ID.NO 31]ATGCACGTAC TGCTGAAATG AG / [SEQ.ID.NO 32] FAM-AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC- TAMRA / [SEQ.ID.NO 33] GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TT

[SEQ.ID.NO 6]AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG /[SEQ.ID.NO 32]
FAM-AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 23]
CATTGTTTAGCTGT GATCCGTAC T
[SEQ.ID.NO 24]GCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAG/[SEQ.ID.NO 32]
FAM-AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 8]
GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT

Pseudomonas aeruginosa (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 7)
[SEQ.ID.NO 9] CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 34] FAM
- CAATTGCTGC TGGACTATGT ATCTG- TAMRA /[SEQ.ID.NO 1]
CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 35] CAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC/[SEQ.ID.NO 34]
FAM-CAATTGCTGC TGGACTATGT ATCTG-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 11]
CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 9] CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 36] FAM-
AACGCCGA AGAACTCCAG CATTTCTGC-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 26]
GCTGAAGGTCC TGCGGCAACA G

[SEQ.ID.NO 9] CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 36] FAM-
AACGCCGA AGAACTCCAG CATTTCTGC-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 11]
CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT

Escherichia coli (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 11)

[SEQ.ID.NO 12] GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG / [SEQ.ID.NO 13]
FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA / [SEQ.ID.NO 37]
CATTTCTGGC CTCGAACAAT TA

[SEQ.ID.NO 27] TAGAACGTAA TGGTTCTGTGC AT/[SEQ.ID.NO 38]
FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 14]
GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG

[SEQ.ID.NO 12] GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG/[SEQ.ID.NO 38]
FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 37]
CATTTCTGGC CTCGAACAAT TA

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG /[SEQ.ID.NO 13]
FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA / [SEQ.ID.NO 28]
CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG/[SEQ.ID.NO 38]
FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 28]
CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG/[SEQ.ID.NO 38]
FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 37]
CATTTCTGGC CTCGAACAAT TA

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG/[SEQ.ID.NO 38]
FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 14]
GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG

Salmonella ssp (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 15)

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 16]
FAM-CTTCTCTATTGTCACCGTGG TCCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 21]
FAM-TT(T/C)GTTATTGGCGATAGCCTGGC-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 22]
TAMRA-TTCTCTGGATGGTATGCCCGGTA-FAM /[SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 41] FAM-TTTGTTGTCT TCTCTATTGT CACC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17] GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 15] GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC/[SEQ.ID.NO 41] FAM-TTTGTTGTCT TCTCTATTGT CACC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17] GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

Bakterien (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 20)

[SEQ.ID.NO 18] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19] FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 42] AAGTCGTAAC AAGGTAACCA

[SEQ.ID.NO 29] TGCATGGCTG TCGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19], FAM - TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC - TAMRA / [SEQ.ID.NO 42] AAGTCGTAAC AAGGTAACCA

[SEQ.ID.NO 43] GGATTAGATA CCCTGGTAGT C / [SEQ.ID.NO 30] FAM - TTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGC - TAMRA / [SEQ.ID.NO 20] CTTGTACACA CCGCCCGTCA

[SEQ.ID.NO 43] GGATTAGATA CCCTGGTAGT C / [SEQ.ID.NO 30] FAM - TTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGC - TAMRA / [SEQ.ID.NO 42] AAGTCGTAAC AAGGTAACCA

Enterobacteriaceae (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 30)

[SEQ.ID.NO 44] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 46] FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 44] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 52] FAM-ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACG-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 50] GTGCTGCATG GCTGTCGTC / [SEQ.ID.NO 52] FAM-ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACG-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 53] GCTGTCGTCA GCTCGTGTT / [SEQ.ID.NO 46] FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 53] GCTGTCGTCA GCTCGT GTT / [SEQ.ID.NO 46] FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 54] AACTTTATGA GGTCCGCTTG C

[SEQ.ID.NO 44] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 46] FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA /[SEQ.ID.NO 54] AACTTTATGA GGTCCGCTTG C

Entwicklung eines PCR-Schnelltests zum Nachweis von Enterobacteriaceae

Die nachfolgenden Beispiele beschreiben den entwickelten Schnelltest inklusiv aller Sequenzvariationen und Targetsequenzen.

(I) Schnelltest zum Nachweis von Enterobacteriaceae mit Angabe der Target-Sonden- und Primersequenzen **(Beispiele 27-31)**

(III) Fehlvarianten in den Primer- und Sondensequenzen **(Beispiel 32)**

Beispiel 27

Nachweis von Arten der Familie Enterobacteriaceae

Für die Entwicklung eines diagnostischen PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae wurde ein Gen gesucht, das auf der einen Seite genügend konservierte Bereiche aufweisen konnte, um die zahlreichen Arten der Familie Enterobacteriaceae nachweisen zu können, das auf der anderen Seite aber auch ausreichend variable

Bereiche enthalten mußte, um die Detektion der nicht zu den Enterobacteriaceae gehörenden Bakterien ausschließen zu können. Mit dem bakteriellen 16S rRNA-Gen wurde ein Target gewählt, das beide Bedingungen erfüllt.

Das 16S rRNA-Gen kodiert für die bakterielle ribosomale DNA, die zusammen mit der 23S rRNA und der 5S rRNA in Kombination mit den ribosomalen Proteinen den Translationsapparat für die Proteinbiosynthese bilden.

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende spezifische DNS-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

Als Ergebnis von Sequenzvergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten wurde für den Nachweis von Enterobacteriaceae folgende optimale Kombination von Primern und Sonde ermittelt:

Forward-Primer (#1053) **5´-GCA TGG CTG TCG TCA GCT C-3´** [SEQ. ID. NO. 44]
Reverse-Primer (#1270) **5´-TTT ATG AGG TCC GCT TGC TC-3´** [SEQ. ID. NO.45]

Sonde (#1090) **5´-Fam-TTA AGT CCC GCA ACG AGC GCA AC-Tamra-3´** [SEQ. ID. NO. 46]

Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert wurden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

Die numerischen Bezeichnungen der Oligonukleotide beziehen sich auf die Positionen des Leitstranges der von Brosius et al. 1978 veröffentlichten Sequenz für die 16S rRNA von *Escherichia coli.*

Die Lokalisation dieser Sequenzen innerhalb des 16S rRNA-Gens ist in SEQ. ID. NO. 24 dargestellt. Die Größe des durch die Primer 1053 und 1270 begrenzten Amplikons beträgt 238 bp.

Targetsequenz des 16S rRNA Gens SEQ. ID. NO. 47
(Forward-Primer #1053) 5´-**GCATGGCTGTCGTCAGCTC**-3´ aus
5´-

CTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAA 1082
GAAGCCCTTGGCACTCTGTCCACGACGTACCGACAGCAGTCGAGCACAACACTTT

Seqence Idenifier Number 48: (Sonde #1090)
5´-Fam-TTAAgTCCCgCAACgAgCgCAAC-Tamra-3´ aus
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCC 1137
ACAACCCAATTCAGGGCGTTGCTCGCGTTGGGAATAGGAAACAACGGTCGCCAGG
GGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGAC 1192
CCGGCCCTTGAGTTTCCTCTGACGGTCACTATTTGACCTCCTTCCACCCCTACTG
GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCAT 1247
CAGTTCAGTAGTACCGGGAATGCTGGTCCCGATGTGTGCACGATGTTACCGCGTA
ACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTC 1302
TGTTTCTCTTCGCTGGAGCGCTCTCGTTCGCCTGGAGTATTTCACGCAGCATCAG

Sequence Identifier Number 49: 3´-TCGTTCGCCTGGAGTATTT-5´
(Reverse-Primer #1270)

Lokalisation der Primer und der Sonde für den spezifischen Nachweis für Enterobacteriaceae: Dargestellt ist ein Ausschnitt der für die 16S rRNA codierenden Sequenz. Die Ziffern am rechten Rand der Sequenz geben die Position des jeweils letzten in einer Zeile stehenden Nukleotids an. Die Positionen beziehen sich auf die von Brosius et al. (1978) veröffentlichte Sequenz. Die Primer und die Sonde sind entsprechend ihrer Position im 16S rRNA-Gen aufgeführt. FAM: Fluorescein-Derivat als Reporter, TAMRA: Tetramethylrhodamin-Derivat als Quencher.

Beispiel 28

PCR-Bedingungen für den Nachweis von Enterobacteriaceae

Zusammensetzung und Komponenten des TaqMan-PCR-Reaktionsansatzes für den Nachweis von Enterobacteriaceae:

In Spalte eins sind die einzelnen Komponenten des PCR-Reaktionsamsatzes aufgelistet. Die eingesetzten Volumina pro Reaktionsansatz sind in Spalte zwei aufgeführt, während Spalte drei die finale Konzentration der einzelnen Komponenten im Reaktionsansatz wiedergibt. In Spalte vier sind die Stoffmengen der einzelnen Komponenten für eine 50 µl-PCR angegeben. UNG: Uracil-N-Glycosylase.

Komponente	Volumen	finale Konzentration	Stoffmenge (in 50µl)
Template (DNA)	5.00 µl	0.1 fg/µl - 20pg/µl	5fg-1ng
Aqua bidest.	11.25 µl	/	/
10x TaqMan-Puffer A	5.00 µl	1x	/
25 mM $MgCl_2$	7.00 µl	3.5 mM	175 nmol
1,25 mM dATP	2.00 µl	50 µM	2.5 nmol
1,25 mM dCTP	2.00 µl	50 µM	2.5 nmol
1,25 mM dGTP	2.00 µl	50 µM	2.5 nmol
2,50 mM dUTP	2.00 µl	0.1 mM	5.0 nmol
3 µM Forward-Primer #1053	5.00 µl	0.3 µM	15.0 pmol
3 µM Reverse-Primer #1270	5.00 µl	0.3 µM	15.0 pmol
2 µM Sonde #1090	3.00 µl	0.12 µM	6.0 pmol
5 U/µl AmpliTaq Gold	0.25 µl	25 mU/µl	1.25 U
1 U/µl AmpErase UNG	0.50 µl	10 mU/µl	0.5 U
	Σ 50.0 µl		

Folgendes PCR-Zyklenprofil wurde für den Nachweis von Enterobacteriaceae erstellt:

Schritt	Dauer In min	Temperatur In °C	Wiederholungen
Halten1	2	50	1
Halten 2	10	95	1
Cyclus 1	¼	95	40
	1	60	
Halten 3	2	25	1

PCR-Profil für den Nachweis von Enterobacteriaceae.

In Spalte eins sind die einzelnen Komponenten des PCR-Reaktionsamsatzes aufgelistet. Die eingesetzten Volumina pro Reaktionsansatz sind in Spalte zwei aufgeführt, während Spalte drei die finale Konzentration der einzelnen Komponenten im Reaktionsansatz wiedergibt. In Spalte vier sind die Stoffmengen der einzelnen Komponenten für eine 50 µl-PCR angegeben. UNG: Uracil-N-Glycosylase.

Beispiel 29

Selektivität zum Nachweis von Enterobacteriaceae:

Die gram-negative Familie der Enterobacteriaceae gehört zur Gamma-Gruppe der Proteobacteria (Balows et al. 1991, Holt 1989). Zu den Proteobacteria gehören außerdem die Mitglieder der Alpha-, der Beta-, der Delta-, und der Epsilon-Gruppe

sowie Amoebobacter und einige unklassifizierte Proteobacteria. Abbildung 9 zeigt ein vereinfachtes taxonomisches Schema zur Einordnung der Enterobacteriaceae.

Die Ähnlichkeit von DNA-Sequenzen verschiedener Spezies steigt in der Regel mit zunehmendem Verwandtschaftsgrad. Die Möglichkeit einer nicht-erwünschten Kreuzreaktion ist deshalb bei nah-verwandten Spezies wahrscheinlicher, als bei weniger verwandten Spezies. Die Spezifität des entwickelten PCR-Schnelltests zum Nachweis von Enterobacteriaceae wurde deshalb vor allem an genomischer DNA von nahen Verwandten der Enterobacteriaceae untersucht.

Dreißig verschiedene Enterobacteriaceae-Arten und vierzehn nicht zu den Enterobacteriaceae zählende Bakterienarten wurden überprüft.

Alle getesteten Gattungen der Enterobacteriaceae wurden durch den entwickelten PCR-Schnelltest erfaßt. Die mit Enterobacteriaceae stark verwandten Bakterien, zu denen insbesondere die Vertreter der Gamma-Gruppe zu zählen sind, als auch kaum verwandte Bakterien, vor allem die Vertreter der Firmicutes (gram positive-Bakterien), zeigten dagegen keine Reaktion mit dem System.

Liste der getesteten Enterobacteriaceae:

Jeweils 1 ng genomische DNA der in Spalte eins aufgeführten Spezies der Enterobacteriacea wurden zur Spezifitätsprüfung eingesetzt. Die verwendeten Stämme können Spalte zwei entnommen werden. In Spalte drei ist das Resultat der jeweiligen Untersuchung als + (positive Reaktion) bzw. - (negative Reaktion) mit dem PCR-Schnelltest für Enterobacteriaceae angegeben.

Arten der Familie **Enterobacteriaceae**	**Stämme**	**Resultat (+/-)**
Budvicia aquatica	DSM 5075	+
Buttiauxella agrestris	DSM 4586	+
Cedecea davisae	DSM 4568	+
Citrobacter freundii	DSM 30040	+
Edwardsiella tarda	DSM 30052	+
Enterobacter cloacae	DSM 30054	+
Erwinia amylovora	DSM 30165	+
Escherichia coli	ATCC 8739, DSM 301, DSM 787	+
Ewingella americana	DSM 4580	+
Hafnia alvei	DSM 30163	+
Klebsiella pneumoniae	DSM10031	+
Kluyvera ascorbata	DSM 4611	+
Leclercia adecarboxylata	DSM 5077	+
Leminorella grimontli	DSM 5078	+
Levinea malonatica	DSM 4596	+

Moellerella wisconsensis	DSM 5076	+
Morganella morganii	DSM 30164	+
Pantoea agglomerans	DSM 3493	+
Photorhabdus luminescens	DSM 3368	+
Pragia fontium	DSM 5563	+
Proteus mirabilis	DSM 788	+
Providencia stuartii	DSM 4539	+
Rhanella aquatilis	DSM 4594	+
Salmonella typhimurium	ATCC 13311	+
Serratia marcescens	DSM 3370	+
Shigella flexneri	DSM 4782	+
Tatumella ptyseos	DSM 5000	+
Xenorhabdus nematophilius	DSM 3370	+
Yersinia enterocolitica	DSM 4780	+

Liste der getesteten Bakterienstämme, die nicht den Enterobacteriaceae zugerechnet werden:

Jeweils 2 ng genomische DNA der in Spalte eins aufgeführten Bakterienspezies wurden zur Spezifitätsprüfung eingesetzt. Die Zugehörigkeit der jeweiligen Spezies zu einer bestimmten Überordnung zeigt Spalte 2. Die verwendeten Stämme können Spalte drei entnommen werden. In Spalte vier ist das Resultat der jeweiligen Untersuchung als + (positive Reaktion) bzw. - (negative Reaktion) mit dem PCR-Schnelltest für Enterobacteriaceae angegeben.

Nah verwandte Arten der Enterobacteriaceae	**Einordnung**	**Stamm**	Resultat **(+/-)**
Acetobacter pasteurianus	Gamma-Gruppe	DSM 3509	-
Acinetobacter calcoaceticus	Gamma-Gruppe	DSM 6962	-
Aeromonas enteropelogenes	Gamma-Gruppe	DSM 6394	-
Alcaligenes faecalis	Beta-Gruppe	DSM 30030	-
Chromobacterium violaceum	Beta-Gruppe	DSM 30191	-
Enterococcus faecalis	Firmicutes	ATCC 29212	-
Halomonas elongata	Gamma-Gruppe	DSM 2581	-
Helicobacter pylori	Epsilon-Gruppe	DSM 4867	-
Listeria monocytogenes	Firmicutes	DSM 20600	-
Micrococcus luteus	Firmicutes	DSM 1605	-
Pseudomonas aeruginosa	Gamma-Gruppe	DSM 3227	-
Staphylococcus aureus	Firmicutes	ATCC 6538P	-
Staphylococcus epidermidis	Firmicutes	ATCC 12228	-
Vibrio proteolyticus	Gamma-Gruppe	DSM 30189	-

Beispiel 30

Sensitivität des PCR-Schnelltests

Für die Experimente zur Bestimmung der Sensitivität des PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae wurde stellvertretend für die übrigen Enterobacteriaceae genomische *Escherichia coli*-DNA vom Stamm ATCC 8739 eingesetzt. Die Detektionsbreite des entwickelten PCR-Schnelltest für Enterobacteriaceae reicht nach diesen Untersuchungen von weniger als 5 KBE (entspricht 25 fg genomischer DNA) bis über 5000000 KBE (entspricht 25 ng genomischer DNA) *Escherichia coli* (Abbildung 10).

No-Template-Kontrollen (ohne Enterobacteriaceae-DNA) zeigen auch nach 40 Zyklen keine Reaktion mit dem entwickelten PCR-Schnelltest.

Beispiel 31

Produktanalyse

Steriles Wasser für Injektionszwecke (WFI, Charge 63022) wurde untersucht. Das Untersuchungsergebnis ergab Abwesenheit von Enterobacteriaceae-DNA.

Beispiel 32

Fehlvarianten in den Primer- und Sondensequenzen

Als Fehlvarianten werden die Primer- / Sondenkombinationen definiert, die die Target-DNS-Sequenzen mit nicht zufriedenstellender Spezifität (<100%) und Sensitivität (<70%) detektieren, wie die in Beispiel 27 angegebenen Sequenzen.

Literatur für die Beispiele:

Balows, A., Truper, H., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H. (1991)
The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Second Edition,
Vol 1-4, Springer-Verlag, New York NY

Brosius, J., Palmer, J. L., Kennedy, J.P. & Noller, H.F. (1978)
Complete Nucleotide Sequence of a 16S Ribosomal RNA Gene from *Escherichia coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4801-4805

Holt, J. (editor in chief) (1989) Bergey's Manual of Systematic Becteriology, First Edition, Vol 1-4, Williams & Williams, Baltimore MD

Legenden zu den Abbildungen

Legende zur Abb. 1:

Die DNA (10 ng pro Spur, 2-14) aller eingesetzten *S. aureus* Stämme (Lane 2 – 5) wurde von den *cap8-0* Primern (# 15297 und # 15485) detektiert. Dem gegenüber wurde die DNA einer nahe verwandten *Staphylococcus* Art. *S-. epidermidis* (Lane 6), und die anderer bakterieller Gattungen (Lane 7 – 11) nicht detektiert. Pilz, Fisch und menschliche DNA (Lane 12 – 14) wurden als Kontrollen eingesetzt und ergaben kein Detektionssignal. NTC (= no template control) ist die Wasserkontrolle, in der keine DNA eingesetzt wurde.

Legende zur Abb. 6:

Die DNA (1 - 10 ng) aller eingesetzten Bakterien (*Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus faecalis*) wurde von dem 16S rRNA Primer/Sonden Set detektiert. Wurde genomische DNA (10 ng) von Pilzen (*Neurospora crassa*), Pflanzen (*Arabodopsis thaliana*) oder vom Menschen (*Human*,Perkin Elmer ABI, 401846) eingesetzt, so entsprach die gemessene Fluoreszenzstrahlung der Wasserkontrolle (no DNA control).

Legende zur Abb. 7

Fluoreszenzstrahlung in Abhängigkeit von der Menge an eingesetzter Salmonella DNS. In dem PCR-Schnelltest wurden *Salmonella* DNS Mengen eingesetzt, die aus 1-3, 50, 500 usw. Keimen isoliert wurde. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz wird als sogenannter RQ Wert angegeben.

$RQ = (R^+ / Q) - (R^- / Q)$

Legende zur Abb. 8:

Wasser für Injektionszwecke (10 ml Analysenvolumen) wurde jeweils in vier unabhängigen Experimenten auf die Gegenwart von Bakterien analysiert. Als positive Kontrolle wurden 250 fg genomischer Salmonella DNS eingesetzt (Abb. 8, ganz links). Parallel wurde das Prüfprodukt mit 50 KBE / 10 ml Salmonella gespikt und dann analysiert (jeweils rechts). Es werden die Einzelergebnisse dargestellt.

Legende zur Abb. 9:

Schematische Darstellung taxonomischer Beziehungen der Enterobacteriaceae:
Die einzelnen Gattungen der Enterobacteriaceae gehören zur Gamma-Gruppe der Proteobacteria. Diese sind eingegliedert in die Eubacteria. Aus diesem Schema ergaben sich die Überlegungen zu den Spezifitätsprüfungen. Zum Nachweis der Spezifität des entwickelten PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae wurden hauptsächlich Vertreter der Gamma-Gruppe und einige Mitglieder anderer Gruppen der Proteobacteria herangezogen.

Legende zur Abb. 10:

Sensitivität des PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae:
Dargestellt sind die erhaltenen Ct-Werte in Abhängigkeit der eingesetzten keimbildenden Einheiten (KBE) Enterobacteriacea.

Patentansprüche:

1. Testkit zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht steriler Produkte, insbesondere nach GMP-Richlinien, auch Kosmetika und Lebensmittel, umfassend mindestens ein DNA-Fragment, das die folgenden SEQ ID und Spacer (Abstandhalter) umfaßt:

(a) einen Forward-Primer (SEQ ID Forward-Primer);

(b) eine Sonde (SEQ ID Sonde);

(c) einen Reverse-Primer (SEQ ID Reverse-Primer);

(d) gegebenenfalls einen Spacer zwischen Forward-Primer und Sonde,

(e) gegebenenfalls einen Spacer zwischen Sonde und Reverse-Primer,

(f) gegebenenfalls einen Spacer upstream des Forward-Primers

(g) gegebenenfalls einen Spacer downstream des Reverse-Primers

- wobei die SEQ ID [(SEQ ID Forward-Primer); (SEQ ID Sonde); und (SEQ ID Reverse-Primer)] auch Varianten umfassen, bei denen eine, zwei oder drei Nukleotide substituiert, deletiert und / oder insertiert sind,

dabei hat die Variante im wesentlichen dieselbe Funktion wie die Sequenz der SEQ ID [(SEQ ID Forward-Primer); (SEQ ID Sonde); und (SEQ ID Reverse-Primer)],

bei Sonden die Funktion der Bindung an DNA und
bei Primern die Funktion der Bindung an DNA und die Bereitstellung eines verlängerbaren 3' Endes für die DNA-Polymerase;

- wobei die Spacer 0-40 Nukleotiden umfassen,

das DNA-Fragment genommen aus der Gruppe

(i) für *Staphylococus aureus*
SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer

(ii) für *Pseudomonas aeruginosa*
SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer

(iii) für *Escherichia coli*
SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer

(iv) für *Salmonella ssp.*
SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer

(v) für Bakterien
SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer

(vi) für Enterobacteriaceae
SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer
oder

(vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)
SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer

oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen SEQ ID NO 6 bis 49 sind.

2. Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen in Produkten, insbesondere Arzneimitteln oder Kosmetika, welches Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

a) Einsetzen von Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden mit den entsprechenden Sequenzen und deren Variationen,

(i) für *Staphylococus aureus*
SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer

(ii) für *Pseudomonas aeruginosa*
SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer

(iii) für *Escherichia coli*

SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer

(iv) für *Salmonella ssp.*

SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer

(v) für Bakterien

SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer

(vi) für Enterobacteriaceae

SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer oder

(vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)

SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer

oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen SEQ ID NO 6 bis 49 sind.

b) Vervielfältigen der DNA mit PCR; und

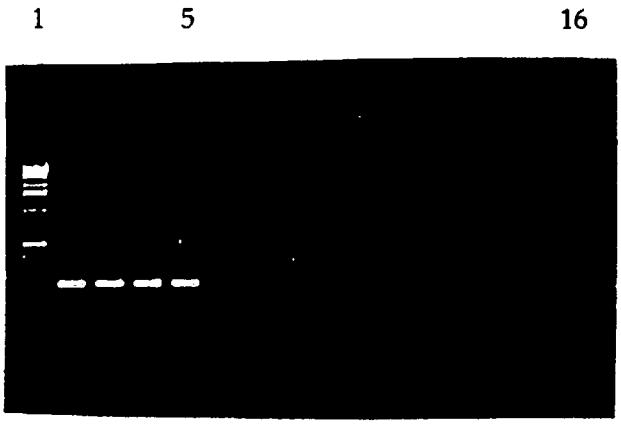
c) Bestrahlung mit spezifischen Wellenlängen, die den Fluoreszenzfarbstoff anregen.

d) Messung und Quantifizierung der Emission des angeregten Fluoreszenzfarbstoffes.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Herstellung der Sonden auf der TaqMan-Detektionstechnologie beruht.

Abb. 1

Abb. 1



Lane
1. Größenstandard
2. S. aureus DSM 683
3. S, aureus DSM 6148
4. S. aureus DSM 346
5. S. aureus DSM 1104
6. S. epidermidis DSM 1798
7. Bacillus subtilis
8. Pseudo. aeruginosa
9. Salmonella typhi.
10. Streptococcus faecalis
11. Escherichia coli .
12. Neurospora crassa
13. Human
14. Salmon Sperm
15. NTC (no tamplate control
16. NTC

Abb. 2

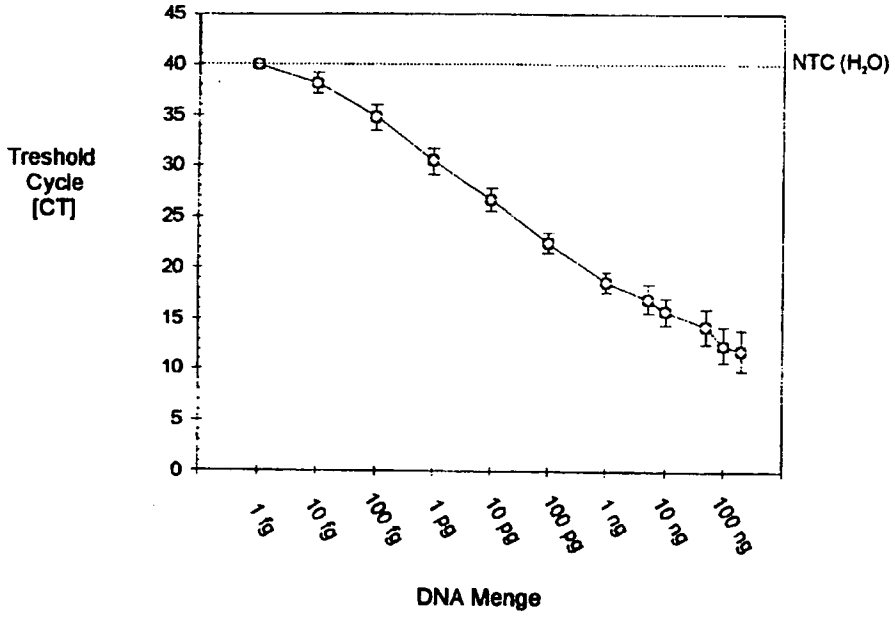

45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
NTC (H_2O)
Treshold Cycle [CT]
1 fg
10 fg
100 fg
1 pg
10 pg
100 pg
1 ng
10 ng
100 ng
DNA Menge

Abb. 3

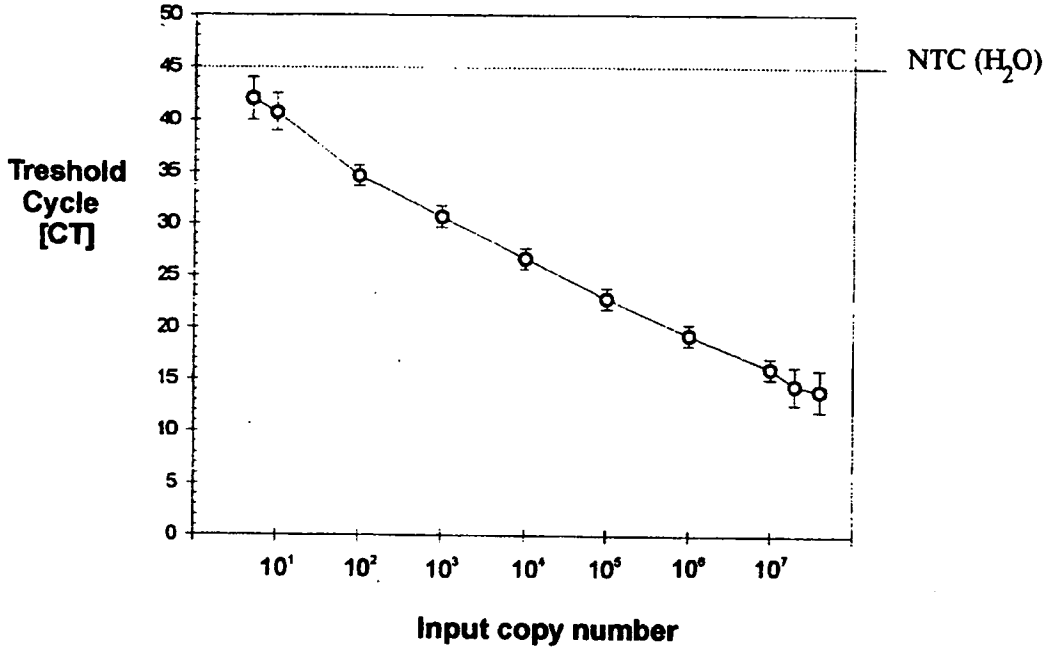
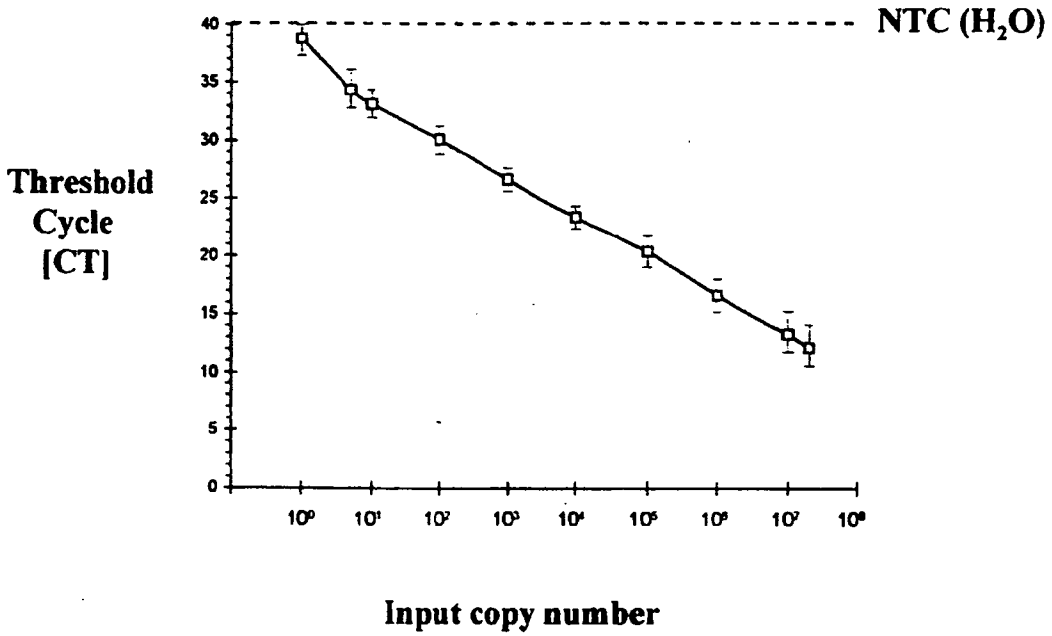

Treshold Cycle [CT]
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
NTC (H_2O)
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
Input copy number

Abb. 4

Escherichia coli murA Amplification



5

Abb. 5

Salmonella sp. *inv*A Amplification

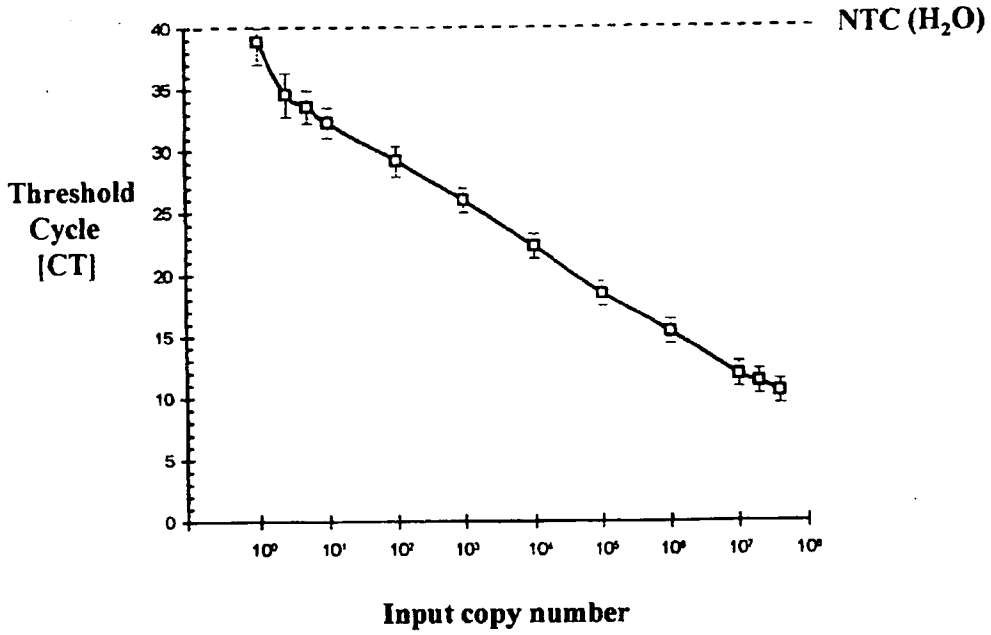


Abb. 6

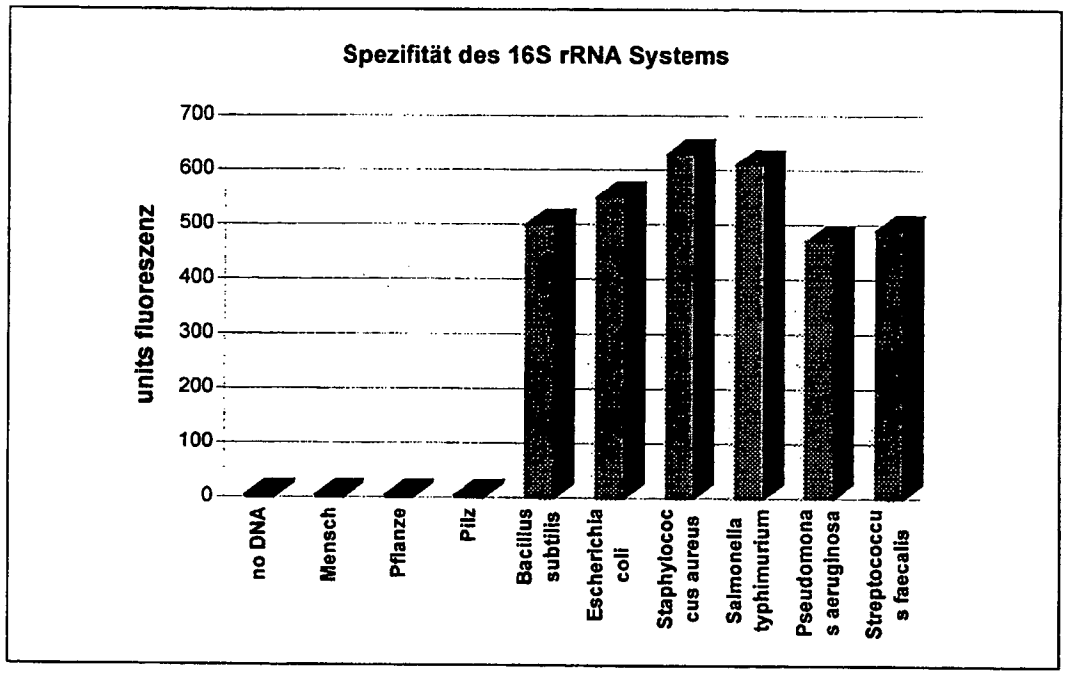
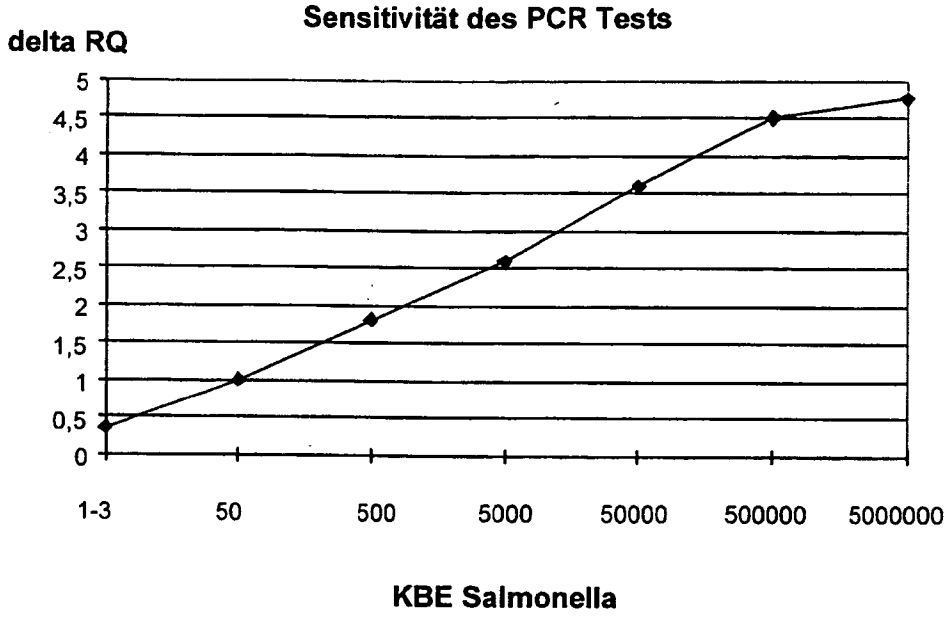

Spezifität des 16S rRNA Systems
units fluoreszenz
700
600
500
400
300
200
100
0
no DNA
Mensch
Pflanze
Pilz
Bacillus subtilis
Escherichia coli
Staphylococcus aureus
Salmonella typhimurium
Pseudomonas aeruginosa
Streptococcus faecalis

Abb. 7


Sensitivität des PCR Tests
delta RQ
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1-3
50
500
5000
50000
500000
5000000
KBE Salmonella

5

Abb. 8

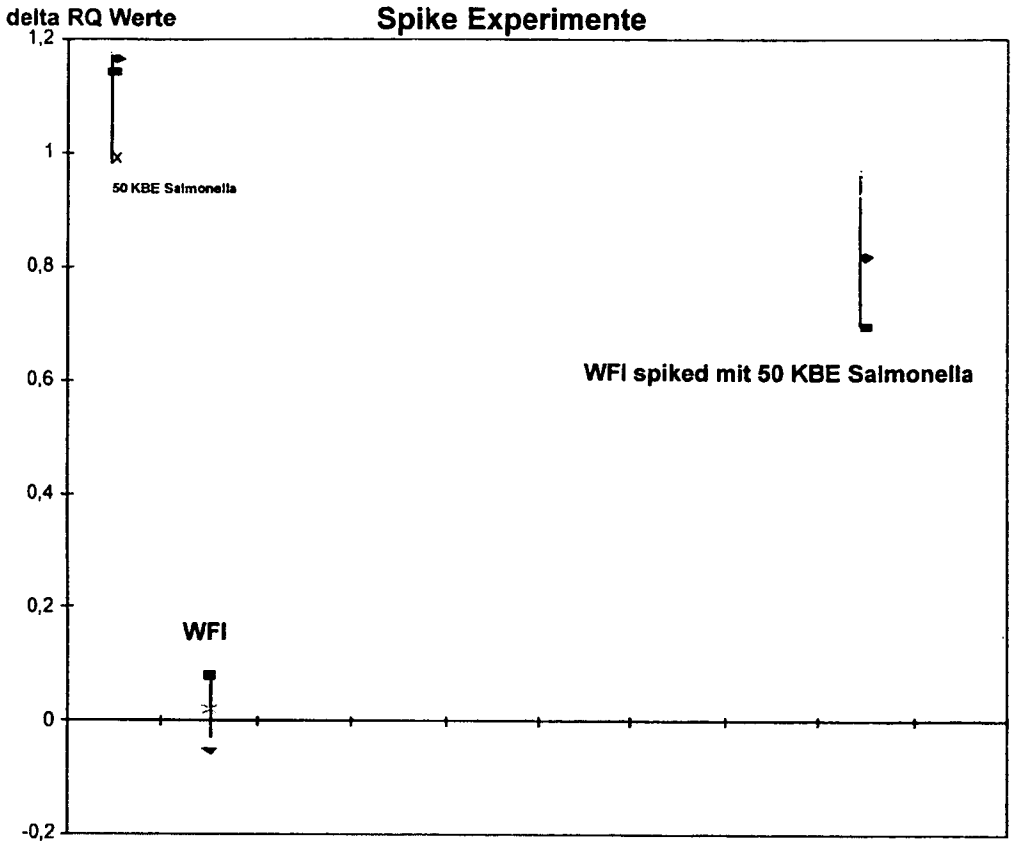

delta RQ Werte
Spike Experimente
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
-0,2
50 KBE Salmonella
WFI spiked mit 50 KBE Salmonella
WFI

Abb. 9

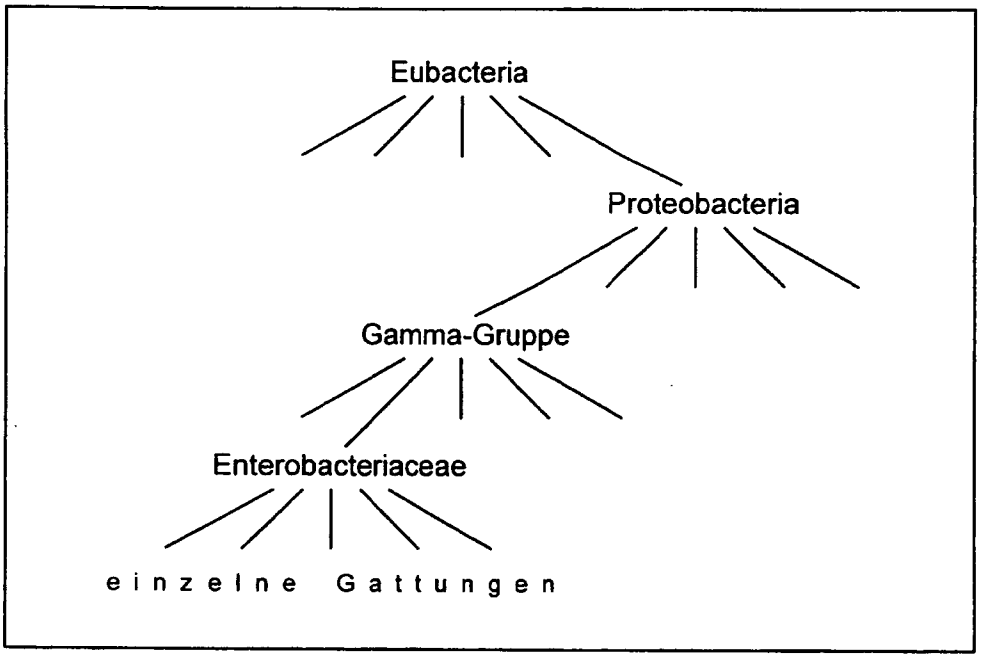
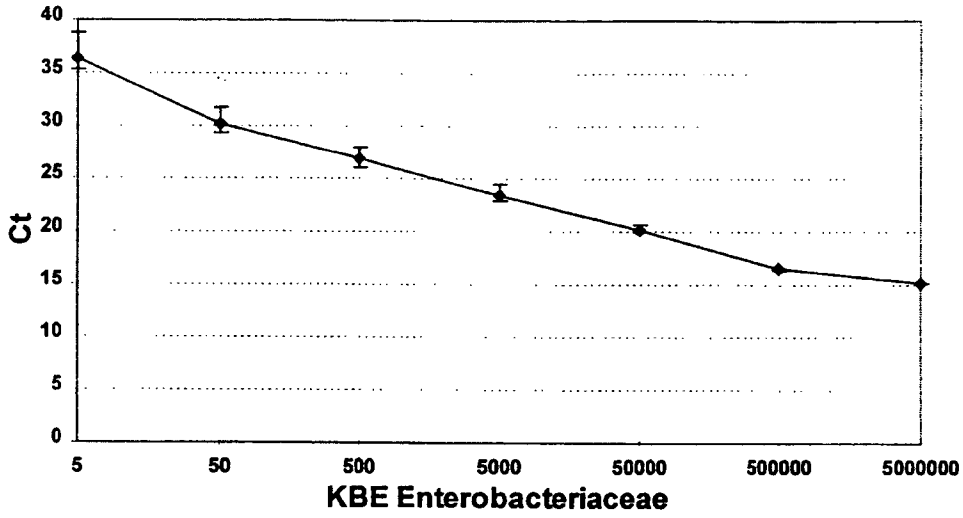

Eubacteria
Proteobacteria
Gamma-Gruppe
Enterobacteriaceae
einzelne Gattungen

Abb. 10


40
35
30
25
20
15
10
5
0
Ct
5
50
500
5000
50000
500000
5000000
KBE Enterobacteriaceae

(1) ALLGEMEINE ANGABEN

(i) ANMELDER:

(A) NAME: **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT**

(B) STRASSE: **MÜLLERSTRASSE 178**

(C) ORT: **13353 BERLIN**

(E) LAND: **DEUTSCHLAND**

(F) POSTLEITZAHL: **13353**

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen in Produkten

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 54 Sequenzprotokolle

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG

(A) DATENTREÄGER: **DISKETTE**

(B) COMPUTER: **486/INTEL**

(C) BETRIEBSSYSTEM: **WINDOWS**

(D) SOFTWARE: **WINWORD;**

(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

Für alle SEQ ID NO 1 bis 54 gilt:

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz
STRANGFORM: Einzelstrangform
TOPOLOGIE: linear
HYPOTHETISCH: nein
ANTISENS: nein

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 214 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Staphylococcus aureus
MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Staphylococcus aureus
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAGCT AATGGAAAAC      040
ACATATAGAG ACGTGAATAT TGCTTTAGCT AATGAATTAA      080
CAAAAATTTG CAATAACTTA AATATTAATG TATTAGTTGT      120
GATTGAAATG GCAAACAAAC ATCCGCGTGT TAATATCCAT      160
CAACCTGGTC CAGGAGTAGG CGGTCATTGT TTAGCTGTTG      200
ATCCGTACTT TATT                                 214
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 310 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Staphylococcus aureus
MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Pseudomonas aeruginosa
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CAGGCCTTCG ATGCCCTGAG CGGTATTCAG GCACCGGCGC 040
CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTCTGCC AATTGCTGCT 080
GGACTATGTA TCTGCCGGAC ACTTCGAGGT CTACGAGCAA 120
CTGACGGCGG AAGGCAAGGC CTTCGGCGAT CAGCGCGGCC 160
TGGAGCTGGC CAAGCAGATC TTCCCCCGGC TGGAAGCCAT 200
CACCGAATCC GCGCTGAACT TCAACGACCG CTGCGACAAC 240
GGCGATTGCC GTGAAGGAGC CTGCCTCATC GCGGAGCTGA 280
AGGTCCTGCG GCAACAGTTG CACGAACGCT 310

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 222 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Staphylococcus aureus
MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Escherichia coli
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AAAGTAGAAC GTAATGGTTC TGTGCATATT GATGCCCGCG 040
ACGTTAATGT ATTCTGCGCA CCTTACGATC TGGTTAAAAC 080
CATGCGTGCT TCTATCTGGG CGCTGGGGCC GCTGGTAGCG 120
CGCTTTGGTC AGGGGCAAGT TTCACTACCT GGCGGTTGTA 160
CGATCGGTGC GCGTCCGGTT GATCTACACA TTTCTGGCCT 200
CGAACAATTA GGCGCGACCA TC 222

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 310 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Salmonella ssp.
MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Salmonella ssp.
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TGATTGAAGC CGATGCCGGT GAAATTATCG CCACGTTCGG 040
GCAATTCGTT ATTGGCGATA GCCTGGCGGT GGGTTTTGTT 080
GTCTTCTCTA TTGTCACCGT GGTCCAGTTT ATCGTTATTA 120
CCAAAGGTTC AGAACGTGTC GCGGAAGTCG CGGCCCGATT 160
TTCTCTGGAT GGTATGCCCG GTAAACAGAT GAGTATTGAT 200
GCCGATTTGA AGGCCGGTAT TATTGATGCG GATGCCGCGC 240
GCGAACGGCG AAGCGTACTG GAAAGGGAAA GCCAGCTTTA 280
CGGTTCCTTT GACGGTGCGA TGAAGTTTAT 310

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 356 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Bakterien
MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Bakterien
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTTGTGAAA TGTTGGGTTA 040
AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTATCCTT TGTTGCCAGC 080
GGTCCGGCCG GGAACTCAAA GGAGACTGCC AGTGATAAAC 120
TGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCAT CATGGCCCTT 160
ACGACCAGGG CTACACACGT GCTACAATGG CGCATACAAA 200

GAGAAGCGAC CTCGCGAGAG CAAGCGGACC TCATAAAGTG 240
CGTCGTAGTC CGGATTGGAG TCTGCAACTC GACTCCATGA 280
AGTCGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGA ATGCCACGGT 320
GAATACGTTC CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCA 356

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer cap-8 forward # 15297*)
MERKMAL: Primer cap-8 forward # 15297*)
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:
AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG 024

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz
STRANGFORM: Einzelstrangform
TOPOLOGIE: linear
HYPOTHETISCH: nein
ANTISENS: nein
ART DES MOLEKÜLS: Sonde cap-8 # 15460*
MERKMAL: Sonde cap-8 # 15460*, als reverse complement eingesetzt, TAMRA vor und FAM nach der Sequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:
CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG 020

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 26 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer cap-8 reverse # 15485
MERKMAL: Primer cap-8 reverse # 15485* als reverse complement eingesetzt
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:
GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT 026

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer *algQ* forward # 876*
MERKMAL: Primer *algQ* forward # 876*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:
CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC 023

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 26 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde *algQ* # 911
MERKMAL: Sonde *algQ* # 911, FAM vor und TAMRA nach der Sequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:
CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC 026

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse Primer Sequence (# 1147):
MERKMAL: Primer *algQ* reverse # 1147* als reverse complement eingesetzt
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:
CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT 023

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Forward Primer Sequence (# 767*):
MERKMAL: Forward Primer Sequence (# 767*):
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:
GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG 024

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde (# 802)
MERKMAL: Sonde (# 802), FAM vor und RAMARA nach der Sequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:
TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT 023

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse Primer Sequence (# 884)
MERKMAL: Reverse Primer Sequence (# 884)als reverse complement eingesetzt
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:
GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG 024

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Forward Primer Sequence (# 269*)
MERKMAL: Forward Primer Sequence (# 269*)
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:
GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC 024

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde (# 333)
MERKMAL: Sonde (# 333), FAM vor und TAMARA nach der Sequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:
CTTCTCTATT GTCACCGTGG TCCA 024

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse Primer Sequence (# 542)

MERKMAL: Reverse Primer Sequence (# 542) als reverse complement eingesetzt
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG **024**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 19 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer 16S rRNA forward # 1053*
MERKMAL: Primer 16S rRNA forward # 1053*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:
GCATGGCTGT CGTCAGCTC **019**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde 16S rRNA # 1090
MERKMAL: Sonde 16S rRNA # 1090, FAM vor und TAMARA nach der Sequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC **023**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer 16S rRNA reverse # 1386*
MERKMAL: Primer 16S rRNA reverse # 1386*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:
TGACGGGCGG TGTGTACAAG **020**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde von Salmonella ssp
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:
TTTGTTATTG GCGATAGCCT GGC **023**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde von Salmonella ssp.
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:
TTCTCTGGAT GGTATGCCCG GTA **023**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse Primer
MERKMAL: Reverse Primer für Staphylococcus aureus
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:
CATTGTTTAG CTGT TGATCC GTAC T **025**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer *für Staphylococcus aureus*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:
GCACGT ACTG CTGAAA TGAG TAAG **024**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 21 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für Pseudomonas aeruginosa
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:
CAGGCCTTCG ATGCCCTGAG C **021**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Reverse Primer *für Pseudomonas aeruginosa*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:
GCTGAAGGTC CTGCGGCAAC AG **022**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für E. coli
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:
TAGAACGTAA TGGTTCTGTG CAT **023**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Reverse Primer für *E. coli*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:
CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG 023

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für Bakterien
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:
TGCATGGCTG TCGTCAGCTC **020**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde für Bakterien allgemein
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

TTGGGTTAAG TCCCG CAACG AGC 033

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für *Staphylococcus aureus*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:
ATGCACGTAC TGCTGAAATG AG 032

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 26 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde für *Staphylococcus aureus*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:
AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC 035

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Reverse Primer für *Staphylococcus aureus*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:
GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TT 022

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde für *Pseudomonas aeruginosa*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:
CAATTGCTGC TGGACTATGT ATCTG 025

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für *Pseudomonas aeruginosa*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:
CAACGCCGAA GAACTCCAGC ATTTC 025

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 27 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde für *Pseudomonas aeruginosa*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:
AACGCCGA AG AACTCCAG CA TTTCTGC 027

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer

MERKMAL: Reverse Primer für *Escherichia coli*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:
CATTTCTGGC CTCGAACAAT TA **022**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde für *Escherichia coli*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:
CCGCTGGTAG CGCGTTTTGG TCA **023**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer *für Escherichia coli*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:
ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG **023**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für *Salmonella ssp*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:
TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT **025**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
MERKMAL: Sonde für *Salmonella ssp*
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:
TTTGTTGTCT TCTCTATTGT CACC 024

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Reverse Primer für Bakterien allgemein
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:
AAGTCGTAAC AAGGTAACCA **020**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 21 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Primer
MERKMAL: Forward Primer für Bakterien allgemein
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:
GGATTAGATA CCCTGGTAGT C **021**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Forward-Primer (#1053)
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Forward-Primer (#1053) für Enterobacteriaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:
GCATGGCTGT CGTCAGCTC 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse-Primer (#1270)
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Reverse-Primer (#1270) für Enterobacteriaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:
TTTATGAGGT CCGCTTGCTC 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde (#1090)
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Sonde (#1090) für Enterobacteriaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC 23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 19 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: (Forward-Primer #1053)
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Targetsequenz des 16S rRNA Gens von Enterobacteriaceae
MERKMAL: (Forward-Primer #1053) für Enterobacteriaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:
GCATGGCTGT CGTCAGCTC 19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: (Sonde #1090)
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: (Sonde #1090) für Enterobactereaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC 23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 19 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: (Reverse-Primer #1270)
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: (Reverse-Primer #1270) für Enterobacteriaceae
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:
TCGTTCGCCT GGAGTATTT 19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Forward-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Forward-Primer für Enterobacteriaceae als Fehlsequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:
GTGCTGCATG GCTGTCGTC **20**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 51:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Sonde für Enterobacteriaceae als Fehlsequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 51:
AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CC **23**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 52:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Sonde
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Sonde für Enterobacteriaceae als Fehlsequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 52:
ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACG **23**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 53:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Forward-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Forward-Primer für Enterobacteriaceae als Fehlsequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 53:
GCTGTCGTCA GCTCGTGTT **20**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 54:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN
SEQUENZLÄNGE: 21 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: Reverse-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae
MERKMAL: Reverse-Primer für Enterobacteriaceae als Fehlsequenz
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 54:
AACTTTATGA GGTCCGCTTG C **21**